



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

IMPORTÂNCIA DAS INFECÇÕES POR NOROVÍRUS NA COMUNIDADE

Trabalho submetido por
Maria João Gomes Oliveira
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

outubro de 2014



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

IMPORTÂNCIA DAS INFECÇÕES POR NOROVÍRUS NA COMUNIDADE

Trabalho submetido por
Maria João Gomes Oliveira
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof.^a Doutora Perpétua Gomes

outubro de 2014

*Aos meus pais, ao meu namorado e ao meu irmão,
Sem vós nada disto teria sido concretizável.*

Agradecimentos

O meu sincero agradecimento à Prof.^a Doutora Perpétua Gomes, minha orientadora, pelo conhecimento cedido, apoio e incentivo ao meu interesse para a finalização desta monografia; pelas importantes sugestões críticas, disponibilidade, preciosa orientação e acompanhamento fornecidos durante a sua elaboração.

A todos os docentes do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, pelo estímulo de aprendizagem e transmissão de conhecimentos imprescindíveis.

A todos os farmacêuticos, técnicos de farmácia e assistentes operacionais do Hospital Santo André, pelo respeito e amizade conferidos; um especial e importante agradecimento à Dra. Áurea Bravo e à Dra. Ana Isabel Salgueiro, pelos ensinamentos que nunca esquecerei a nível profissional e pessoal e pelas oportunidades que me concederam durante e após o estágio curricular em farmácia hospitalar. À Dona Leonor Grácio, o meu pilar durante o estágio curricular em farmácia comunitária.

Um enorme agradecimento à minha professora Primária, Emília, a quem devo o meu percurso enquanto estudante, em querer ser e saber sempre mais e, acima de tudo, a nunca baixar os braços. Aos meus explicadores do ensino Secundário e amigos Paula Braçais e António Correia, grandes exemplos de força, determinação e profissionalismo, que me ajudaram a encontrar o caminho a seguir.

Às minhas amigas Stephanie, Joana, Ana Luísa, Ana Teresa e Telma e amigos Alexandre e Gil, por me terem aceitado e compreendido tal como sou, pela franca amizade, paciência e companheirismo. Graças a eles esta jornada tornou-se mais fácil.

Agradeço aos meus pais e ao meu irmão que, à sua maneira, sempre me incentivaram a pensar grande, a querer ser e saber sempre mais e, acima de tudo, pelo amor e apoio incondicionais com que me presentearam, por nunca terem deixado que eu desistisse dos meus objetivos e pelo modelo de determinação e ambição que representam.

Ao Kikas, a minha cara-metade, o meu melhor amigo, o meu grande companheiro. Um enorme e profundo obrigado pelo amor, carinho, amizade, sentido de ambição, força e determinação que me transmitiu e por nunca ter permitido que eu fraquejasse por um segundo que fosse. À família dele, que tão bem me acolheu, pelo apoio fundamental que me ofereceu e pelo exemplo que são.

Resumo

O papel que os Norovírus desempenham na comunidade começou a ser tema recorrente somente nas últimas décadas.

A sua inabilidade de crescimento em culturas celulares, a tardia clonagem e caracterização molecular do genoma do *Norwalk virus*, protótipo deste grupo de vírus, a inexistência de pequenos modelos animais para o seu estudo e, conseqüentemente, o moroso desenvolvimento de métodos de diagnóstico e detecção dos Norovírus resultou, durante muitos anos, em estudos epidemiológicos na área das infecções gastrintestinais dúbios e incompletos.

Atualmente admite-se que estes microrganismos são os principais agentes etiológicos de episódios de gastroenterite aguda, grau anteriormente concedido aos Rotavírus, principalmente entre os indivíduos em idade pediátrica e geriátrica e em imunodeprimidos, com os vírus do genótipo 4 do genogrupo 2 a serem considerados predominantes.

É provável que o desenvolvimento de uma vacina ou de outros fármacos antivirais se torne imprescindível para reduzir as taxas de morbidade e mortalidade associadas à infecção e doença devidas a estes vírus emergentes. Prevalece a necessidade de aumentar o número de ensaios clínicos e estudos de campo para autenticar o potencial destas medidas terapêuticas, uma vez que co-existem vários fatores condicionantes para o seu desenvolvimento, a elevada diversidade genética dos Norovírus e a curta imunidade concedida pela sua inoculação e posterior infecção são considerados os principais.

Palavras-chave: Norovírus, epidemiologia dos Norovírus, epidemiologia dos Norovírus *versus* Rotavírus, terapêutica dos Norovírus.

Abstract

Only in the last few decades the role played by the Norovirus in the community has started to be a recurrent theme.

Their inability to grow in cell culture, late cloning and molecular characterization of *Norwalk virus* genome, prototype of this group of viruses, the lack of small animal models for the study and, therefore, the lengthy development of methods of diagnosis and detection of Norovirus resulted, for many years, in dubious and incomplete epidemiological studies in the area of gastrointestinal infections.

It is currently assumed that these microorganisms are the major etiologic agents of acute gastroenteritis, a degree previously granted to Rotavirus, particularly among individuals in pediatric and geriatric age and in immunocompromised patients, with genotype 4 of genogroup 2 viruses to be considered predominant.

It is likely that the development of a vaccine or other antiviral drugs become essential to reduce morbidity and mortality associated with infection and disease due to these emerging viruses. It is a prevailing need to increase the number of clinical trials and field studies to validate the potential of these therapeutic measures, since there are several constraints for their development, which the high genetic diversity of the Norovirus and the short immunity granted by inoculation and subsequent infection are considered the main factors.

Key-words: Norovirus, epidemiology of Norovirus, epidemiology of Norovirus versus Rotavirus, treatment of Norovirus.

Índice geral

| | |
|---|----|
| Índice de Figuras | 12 |
| Índice de Tabelas | 12 |
| Lista de Abreviaturas e Siglas | 13 |
| Introdução | 15 |
| História | 17 |
| Estrutura morfológica, genómica e proteica | 18 |
| Taxonomia e classificação | 21 |
| Estratégias de replicação..... | 24 |
| Patogénese | 26 |
| Manifestações clínicas | 28 |
| Vias de transmissão | 29 |
| Imunidade, suscetibilidade e resistência..... | 32 |
| Diagnóstico | 36 |
| Epidemiologia | 41 |
| A. Infecção pelos NoV <i>versus</i> infecção pelos RV | 43 |
| B. Sazonalidade dos NoV | 48 |
| C. Grupos de risco | 51 |
| D. Infecção pelos NoV em todo o mundo..... | 55 |
| E. Impacto económico e de recursos | 64 |
| Prevenção e terapêutica da infecção e doença | 66 |
| A. Controlo da infecção | 66 |
| B. Terapêutica..... | 69 |
| Conclusão | 78 |
| Bibliografia..... | 79 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1: Imagem de microscopia eletrónica do NV | 17 |
| Figura 2: Organização do genoma dos NoV | 18 |
| Figura 3: Representação da região de ligação e da relação genética das interfaces de ligação aos HBGA de alguns genótipos dos NoV..... | 19 |
| Figura 4: Família <i>Caliciviridae</i> , com o género <i>Recovirus</i> ainda por aprovar como membro dos CV..... | 21 |
| Figura 5: Árvore filogenética dos NoV | 22 |
| Figura 6: Ciclo de replicação dos NoV | 24 |
| Figura 7: Atrofia das vilosidades intestinais associadas à infeção pelos NoV..... | 27 |
| Figura 8: Representação esquemática de 2 vias de transmissão comprovadas dos NoV e da única via de transmissão hipotética, a zoonótica | 30 |
| Figura 9: Etapas necessárias à deteção dos NoV em amostras provavelmente contaminadas | 41 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Etapas para a correta recolha e posterior diagnóstico de amostras suspeitas da presença de NoV..... | 37 |
| Tabela 2: Infeções gastrointestinais devidas aos NoV em comparação com as devidas aos RV. | 45 |
| Tabela 3: Episódios de GEA associados aos NoV em comparação com os associados aos RV, após recomendação da vacinação anti RV dos recém-nascidos. | 48 |
| Tabela 4: Estudos epidemiológicos e moleculares efetuados na área da infeção e doença gastrointestinal causadas pelos NoV, supracitados de forma exaustiva..... | 62 |
| Tabela 5: Precauções gerais a adotar em episódios de GEA..... | 69 |

Lista de Abreviaturas e Siglas¹

3CL^{pro} – 3C-like protease

CD – *Cluster of differentiation*

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CV – Calicivírus

EIA – Ensaio imunoenzimático

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

FUT – Flucosiltransferase

Ga – Genogrupo a

Ga.b – Genótipo b do genogrupo a

GE – Gastreenterite

GEA – Gastreenterite aguda

HBGA – Antígenos de grupos sanguíneos

HuNoV – Norovírus humanos

ICTV – Comité Internacional de Taxonomia de vírus

Ig – Imunoglobulinas

INF – Interferões

mAb – Anticorpos monoclonais

MNV – Norovírus murino

NoV – Norovírus

NTPase – Nucleótido trifosfato

¹ Para algumas abreviaturas e siglas foi adotada a nomenclatura anglo-saxónica, por ser a designação comum e generalizada.

NV – *Norwalk virus*

ORF – Região de leitura aberta

P – *Protruding*

p22 – Proteína 22

p48 – Proteína 48

RdRp – RNA polimerase RNA-dependente

RNA – Ácido ribonucleico

RT-PCR – Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

RV – Rotavírus

S – *Shell*

Se⁺ – Secretores

Se⁻ – Não secretores

SV – Sapovírus

VLP – Partículas semelhantes a vírus

VP – Proteína viral

Introdução

O reconhecimento do impacto dos Norovírus (NoV) na saúde pública tem aumentado significativamente somente nos últimos anos, impulsionado principalmente pelo crescente aumento da notificação de casos esporádicos e epidêmicos de gastroenterite aguda (GEA) associados a estes enteropatogêneos, que permitiram a subsequente realização de estudos moleculares e epidemiológicos nesta área (Oldak, Sulik, Rozkiewicz, & Zawadzka, 2009; Trainor *et al.*, 2013). Desta forma, vários autores consideram os NoV os principais agentes etiológicos de doenças diarreicas endêmicas e da grande maioria das ocorrências de GEA em todo o mundo, especialmente entre os mais novos e mais velhos da comunidade (Hall, 2012; Hall *et al.*, 2013).

“Gastroenterite (GE) é o termo que se aplica, em geral, a um grupo de perturbações cuja causa são as infeções e o aparecimento de sintomas como perda de apetite, náuseas, vômitos, diarreia moderada a intensa, cólicas e mal-estar no abdómen” (Manual Merck, 2009). De entre os possíveis agentes microbiológicos desencadeadores desta doença têm-se as bactérias, os vírus, os fungos, os parasitas, as toxinas e os príões (Li, Predmore, Divers, & Lou, 2012).

De facto, estes vírus possuem todas as características para poderem ser classificados de agentes infecciosos ideais: são extremamente contagiosos; de invasão e proliferação rápida no hospedeiro; em constante evolução, evocando a imunidade limitada; e relativamente virulentos, ou seja, permitem uma fácil e total recuperação da maioria dos indivíduos infetados mantendo assim um elevado número de hospedeiros suscetíveis (Hall, 2012).

Esta monografia objetiva determinar o papel que as infeções devidas aos NoV preconizam na comunidade.

Posto isto, inicia-se a mesma pelo enquadramento histórico da descoberta do *Norwalk virus* (NV), protótipo dos NoV, caracterização das suas partículas virais e classificação taxonómica. A elevada capacidade de contágio e rápida invasão do hospedeiro protagonizada por estes vírus tornou essencial a abordagem às suas estratégias de replicação, patogénese, manifestações clínicas e vias de transmissão. No capítulo seguinte consta uma breve abordagem à aparente suscetibilidade/resistência que alguns indivíduos apresentam contra a infeção pelos NoV, associada à imunidade e provável

predisposição genética do hospedeiro. Dado que a infeção causada por estes patógenos é uma condição de difícil deteção e diagnóstico, apresentar-se-ão as técnicas disponíveis para tal e suas vantagens e desvantagens e ainda, num momento inicial, as considerações mais importantes aquando da recolha de amostras suspeitas da presença de NoV.

Numa outra instância, atendendo especificamente ao tema da presente monografia, consta uma extensa análise epidemiológica, com referência aos episódios de GEA devidos aos Rotavírus (RV) em comparação com os associados aos NoV e à recomendação da vacinação anti RV dos recém-nascidos como premissa para a emergência dos NoV entre os mais novos da comunidade; à sua presumível sazonalidade; aos grupos de indivíduos mais vulneráveis à infeção; às estatísticas a nível mundial das taxas de morbilidade e mortalidade e ao impacto económico e de recursos relacionados com as ocorrências epidémicas de GEA preconizadas por estes vírus.

Por último, a importância da prevenção e terapêutica dos surtos provenientes da fácil transmissão deste conjunto de vírus na comunidade, dando especial ênfase ao controlo da infeção, nomeadamente aos cuidados gerais e específicos a adotar em determinadas instalações, às opções e alvos terapêuticos atuais e futuros e à provável imunização de alguns grupos de indivíduos através da vacinação anti NoV.

Para a redação desta revisão da literatura procedeu-se a pesquisas bibliográficas em bases de dados eletrónicas, designadamente o *PubMed*, *B-on*, *SciELO* e *The Cochrane Library*.

História

A primeira associação entre os vírus da família *Caliciviridae* e a GEA em seres humanos ocorreu em 1929, quando Zahorsky descreveu a *winter vomiting disease*, e depois em 1972, aquando da descoberta do vírus *Norwalk* (Kapikian, 2000; Kapikian *et al.*, 1972; Patel, Hall, Vinjé, & Parashar, 2009).

Kapikian e colaboradores procederam à administração do material fecal de um indivíduo envolvido num surto deste tipo, ocorrido em 1968 numa escola primária em Norwalk, Ohio, a adultos voluntários saudáveis, sob a forma de um filtrado livre de bactérias (Kapikian, 2000). A análise por imunomicroscopia eletrónica das amostras de fezes desses voluntários, designadamente da formação da reação antigénio-anticorpo, permitiu identificar partículas semelhantes a vírus com 27 nanómetros de tamanho, posteriormente designadas por agente *Norwalk*, caracterizando o NV (Figura 1) como o agente etiológico da epidemia ocorrida na escola daquela cidade, semelhante à doença descrita por Zahorsky em 1929 (Kapikian, 2000; Kapikian *et al.*, 1972; Patel *et al.*, 2009).



Figura 1: Imagem de microscopia eletrónica do NV (adaptado de Atmar & Estes, 2001).

Este passou a ser considerado o protótipo de um amplo grupo de vírus, inicialmente designados pela sua forma (*small round structured vírus*) ou por semelhança com o agente *Norwalk* (*Norwalk-like viruses*), e denominados de acordo com o local onde foram pela primeira vez descritos (por exemplo, *Norwalk*, *Snow Mountain* e *Hawaii*), atualmente pertencentes aos NoV (Glass, Parashar, & Estes, 2009; Green *et al.*, 2000; Patel *et al.*, 2009).

Inicialmente, o NV foi descrito como sendo um Picornavírus ou Parvovírus, com base no seu aspeto quando visualizado ao microscópio eletrónico (Kapikian *et al.*, 1972). Entretanto, a identificação de uma única proteína estrutural principal em viriões de NV aproximou-o da família *Caliciviridae* (Greenberg *et al.*, 1981). Contudo, a relação de

parentesco entre o NV e outros Calicivírus (CV) apenas ficou totalmente esclarecida em 1990, após clonagem e caracterização molecular do genoma do *Norwalk virus* por Jiang e colaboradores, única espécie do género *Norovirus* da família *Caliciviridae* (Green *et al.*, 2000; ICTV, 2013; Jiang *et al.*, 1995).

Estrutura morfológica, genómica e proteica

Os NoV são vírus sem invólucro e de diâmetro variável entre os 27 e os 40 nanómetros. A cápside, de simetria icosaédrica, é constituída por 90 dímeros da proteína viral (VP) principal, a VP1, disposta em redor do genoma viral (Atmar & Estes, 2001; Donaldson, Lindesmith, Lobue, & Baric, 2010; Karst, 2010).

O genoma dos NoV é constituído por uma molécula de ácido ribonucleico (RNA) cadeia simples e de polaridade positiva, de aproximadamente 7,7 quilo bases (Glass *et al.*, 2000; Hardy, 2005; Thorne & Goodfellow, 2014). A extremidade 5' do RNA genómico está covalentemente ligada a uma proteína, a VPg, enquanto que a extremidade 3' é poliadenilada (Thorne & Goodfellow, 2014).

Encontra-se organizado em 3 regiões de leitura aberta (ORF, do inglês *open reading frames*): a ORF1, localizada na extremidade 5', a ORF2 e a ORF3, situada na extremidade 3'. A primeira ORF é traduzida como uma grande poli proteína, que é co- e pós-tradução clivada por uma protease codificada por estes vírus - a 3C-like protease (3CL^{pro}, 3C ou Pro) -, para libertar 6 proteínas funcionais não estruturais, incluindo a própria 3CL^{pro}. Essas proteínas não estruturais incluem, além da 3CL^{pro}: a proteína 48 (p48), a nucleótido trifosfato (NTPase ou NTP), a proteína 22 (p22), a VPg e o RNA polimerase RNA-dependente (RdRp ou Pol). A segunda e a terceira ORF, traduzidas a partir do RNA subgenómico, codificam as proteínas estruturais, pertencentes à cápside, VP1, a *major*, e VP2, a *minor*, respetivamente (Figura 2) (Hardy, 2005; Li, Predmore, Divers, & Lou, 2012; Thorne & Goodfellow, 2014).



Figura 2: Organização do genoma dos NoV (adaptado de Donaldson *et al.*, 2010).

Relativamente às proteínas estruturais, a VP1, constituída por 530 a 555 aminoácidos, é a proteína mais abundante da cápside viral, com 180 cópias (Donaldson *et al.*, 2010; Hardy, 2005). Apresenta 2 domínios: o domínio *shell* (S) e o domínio *protruding* (P), unidos de forma flexível (Donaldson *et al.*, 2010; Bertolotti-Ciarlet, White, Chen, Prasad, & Estes, 2002). O domínio S, região mais conservada da sequência, participa na formação do revestimento interno da cápside (Hardy, 2005; Tan, Hegde, Jiang, & Al, 2004; Prasad *et al.*, 1999). Por outro lado, o domínio P, envolvido nos contactos diméricos, é o responsável não só pela constituição das estruturas em forma de arco que emanam da partícula viral, essenciais para as interações virais com o recetor celular (Figura 3), mas também pela estabilidade acrescida da própria cápside e controlo do tamanho das partículas semelhantes a vírus (VLP, do inglês *virus-like particles*), resultantes da expressão das proteínas estruturais virais (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2002; Hardy, 2005; Kniel, 2014; Prasad *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 2004). Este domínio apresenta 2 subdomínios: o P1 e o P2. Sobre o subdomínio P1, este desempenha um papel importante na estabilização das VLP (Chen & Chiu, 2012; Yu, Yan, Li, Pan, & Wang, 2014). Ao subdomínio P2, região altamente variável e localizada à superfície da cápside, é atribuída a antigenicidade do vírus, uma vez que contém epitopos para os anticorpos neutralizantes; a interação vírus-hospedeiro e resposta imune, fundamental para o desenvolvimento de terapêuticas e vacinas eficazes; a formação de fendas de ligação com recetores celulares dos NoV, como por exemplo com os antígenos de grupos sanguíneos (HBGA, do inglês *histo-blood group antigens*); e, por último, a definição das diversas linhagens dos NoV (Chen & Chiu, 2012; Donaldson *et al.*, 2010; Hardy, 2005; Karst, 2010; Li *et al.*, 2012; Prasad *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 2004).

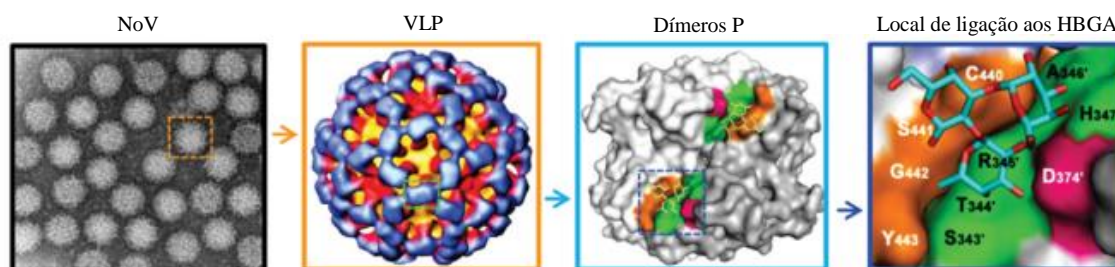


Figura 3: Representação da região de ligação e da relação genética das interfaces de ligação aos HBGA de alguns genótipos dos NoV (adaptado de Tan & Jiang, 2010).

Quanto à VP2, encontra-se implicada na encapsidação do genoma viral, na regulação da montagem do vírus, na expressão da proteína VP1, aumentando a sua eficiência e

estabilidade, e ainda na estabilidade da própria cápside e das VLP (Bertolotti-ciarlet, Crawford, Hutson, & Estes, 2003; Hardy, 2005; Karst, 2010).

Sobre as proteínas não estruturais, a principal função da 3CL^{pro} é somente a clivagem da poli proteína codificada pela ORF1, que origina as 6 proteínas não estruturais dos NoV.

Relativamente à p48, e de acordo com Fernandez-Veja e colaboradores, citados por Hardy (2005), esta apresenta um papel ativo na indução do rearranjo das membranas intracelulares, onde decorre a replicação do RNA viral, e na interação entre os NoV e o complexo de Golgi. É também sugerido que esta possa estar associada à formação do complexo de replicação dos NoV (Karst, 2010; Thorne & Goodfellow, 2014).

A p22 não tem a sua função totalmente esclarecida, apesar de se saber que esta integra o precursor p22-VPg-3CL^{pro} na proteólise (Hardy, 2005). Porém, e por ocupar uma posição no genoma dos NoV semelhante à posição da proteína 3A no genoma dos Picornavírus, pensa-se que esteja igualmente envolvida na formação do complexo de replicação destes vírus e em perturbações a nível do complexo de Golgi (Hardy, 2005; Karst, 2010).

Pressupõe-se que tanto a proteína 48 como a 22 tenham a capacidade de interromper o tráfego proteico intracelular do hospedeiro, o que poderá representar um papel importante na patogénese da infeção pelos NoV, por bloqueio da expressão e secreção à superfície de mediadores imunitários em células infetadas (Karst, 2010).

No que diz respeito à NTPase, apesar de ser capaz de hidrolisar a adenosina trifosfato, não apresenta qualquer atividade de helicase.

A VPg estabelece ligações covalentes com o RNA mensageiro genómico e subgenómico, sendo que se admite que o genoma dos CV, incluindo dos NoV, sem VPg não é infeccioso (Hardy, 2005). Consente-se também que esta proteína seja parte integrante da tradução e replicação do RNA e, portanto, do recrutamento de ribossomas pelo RNA viral e da síntese de proteínas virais (Hardy, 2005; Karst, 2010; Thorne & Goodfellow, 2014).

Por fim, assume-se que a proteína RdRp esteja envolvida na iniciação da síntese do RNA e, assim, na replicação viral (Hardy, 2005; Hoa Tran, Trainor, Nakagomi, Cunliffe, & Nakagomi, 2013).

Taxonomia e classificação

De acordo com o Comité Internacional de Taxonomia de vírus (ICTV, em inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*), a família *Caliciviridae* é atualmente constituída por 5 géneros de vírus: *Lagovirus*, *Nebovirus* (primeiramente denominado como *Beco/Nabovirus*), *Norovirus*, cuja única espécie é o *Norwalk virus*, *Sapovirus* e *Vesivirus* (ICTV, 2013). Os NoV e os Sapovírus (SV) são os únicos grupos de vírus capazes de infetar seres humanos e de, consequentemente, causarem GEA (Thorne & Goodfellow, 2014). Entretanto, a deteção de outro CV nas fezes de uma macaco-*rhesus* poderá levar ao estabelecimento de um novo género, intitulado por agora como *Recovirus* (Figura 4) (Bank-Wolf, König, & Thiel, 2010; Rohayem *et al.*, 2010).

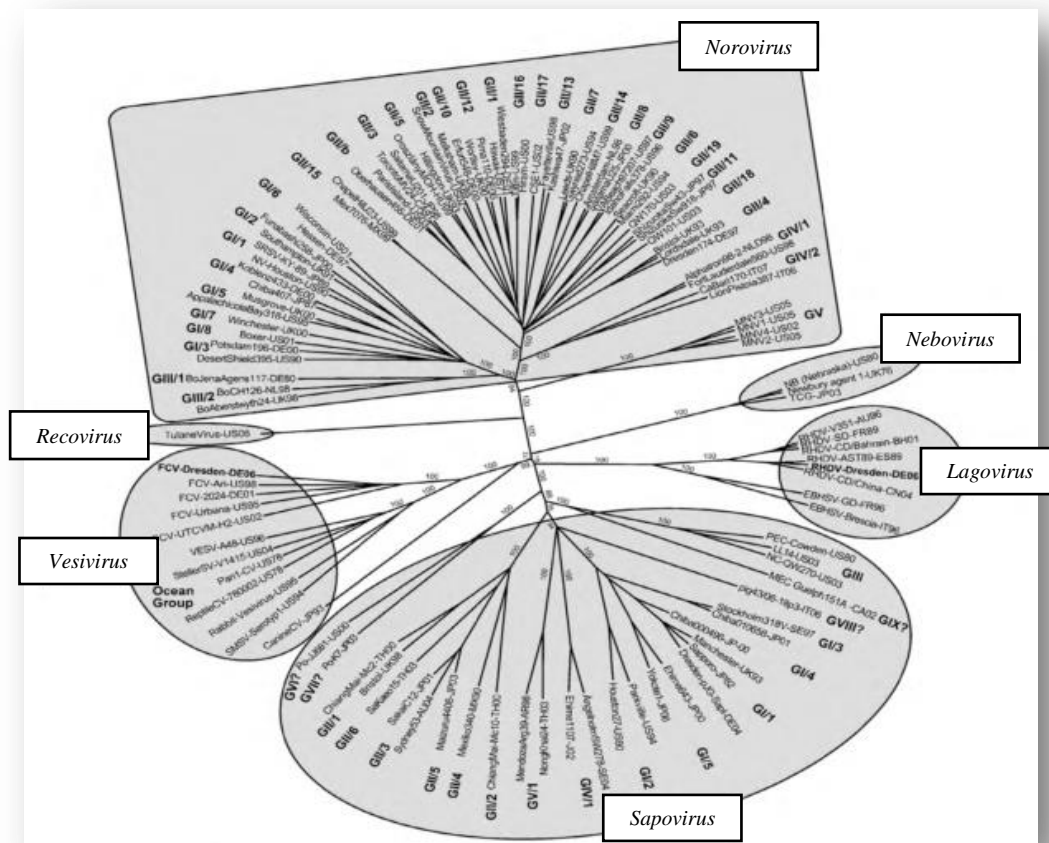


Figura 4: Família *Caliciviridae*, com o género *Recovirus* ainda por aprovar como membro dos CV (adaptado de Rohayem *et al.*, 2010).

Os NoV estão atualmente subdivididos em 6 genogrupos (GI-GVI) (Figura 5), apesar de Phan e colaboradores, citados por Bank-Wolf *et al.* (2010), terem sugerido em 2007, além do GVI, um sétimo genogrupos. Apenas os genogrupos I, II e IV incluem vírus que

infetam humanos, sendo que o GII, em oposição ao GIV, é o responsável pela grande maioria das epidemias de GEA causadas pelos NoV e o GI é frequentemente associado a surtos deste tipo mas pelo consumo de água ou alimentos contaminados por estes vírus (Arvelo *et al.*, 2012; Eden, Hewitt, Lee, Boni, & Merif, 2014; Lim, Eden, Oon, & White, 2013).

Por sua vez, os genogrupos estão subdivididos em genótipos, até ao momento constituídos por mais de 40 estirpes de vírus (Figura 5) (Donaldson *et al.*, 2010; Eden *et al.*, 2014).

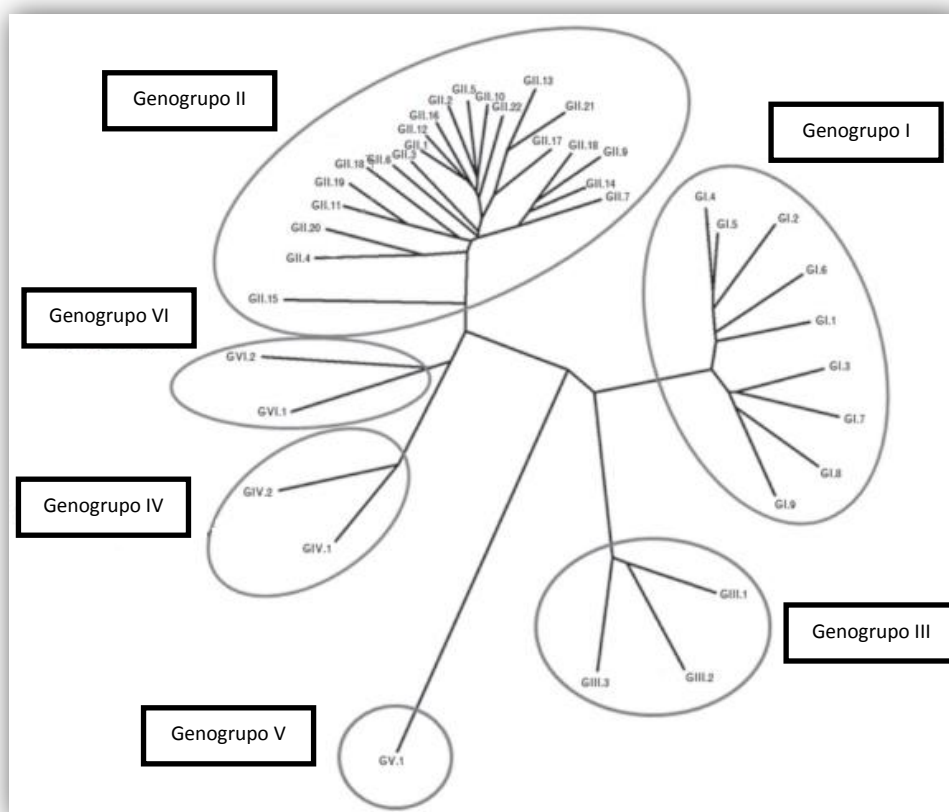


Figura 5: Árvore filogenética dos NoV (adaptado de Ramani, Atmar, & Estes, 2014).

As divisões em genogrupos têm como critério a divergência da proteína VP1, uma vez que exibe uma grande variabilidade na ordem de aminoácidos entre os diferentes genogrupos; por outro lado a divisão em genótipos tem como base a sequência do RdRp ou da própria cápside (Hardy, 2005; Hoa Tran *et al.*, 2013).

As estirpes de um mesmo genótipo apresentam 69 a 97% de similaridade na ordem de nucleótidos a nível genómico, ao contrário das estirpes de diferentes genogrupos, que apenas apresentam uma semelhança de 51 a 56%.

Relativamente às proteínas estruturais, dentro do mesmo genótipo a diferença na sequência dos aminoácidos da cápside é no máximo de 40%, enquanto que entre genogrupos essa diferença ultrapassa os 50% (Donaldson *et al.*, 2010).

Esta diversidade genética, inclusive o surgimento de variantes de genogrupos e genótipos, é atribuída à acumulação de mutações pontuais, devidas a erros na replicação do RNA, e à recombinação entre 2 vírus relacionados, principalmente se se encontrarem em co-circulação (Glass *et al.*, 2009; Ji *et al.*, 2013). A maioria destes recombinantes apresenta pontos de quebra dentro ou próximo da junção ORF1-ORF2, resultando daí a divergência genética maioritária dos NoV (Ji *et al.*, 2013).

Dentro desse grupo, as variantes do genótipo 4 do genogrupo II (GII.4) têm sido consideradas responsáveis pela grande maioria de surtos que têm ocorrido por todo o mundo (mais de 80%) (Hasing *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2013). Mudanças antigénicas têm sido associadas ao bloqueio do epitopo do GII.4, o que suporta o aparecimento das variantes deste genótipo, como a “Sydney 2012”, que parecem ultrapassar a imunidade de grupo.

Embora os determinantes moleculares sejam difíceis de discernir, o aumento do número de epidemias associadas aos NoV, notificadas principalmente após o aparecimento de novas estirpes recombinantes, sugere que as proteínas não estruturais estejam associadas a este fenómeno, e assim a VP1, especificamente o subdomínio P2, não é o único fator de virulência envolvido na doença causada por estes microrganismos. Depois, é também sugerido que a imunidade populacional e a diversidade genética da maior proteína da cápside não são os únicos fatores envolvidos na evasão imune dos NoV. A análise do seu genoma indica que as alterações num único resíduo de aminoácidos dentro da proteína não estrutural p22 ocorreram ao longo do tempo, e portanto esta pode desempenhar um papel importante na evasão à resposta imunitária. Deste modo, assume-se que uma combinação da cápside e das proteínas não estruturais pode ser a responsável pelo desenvolvimento de surtos de GEA devidos aos NoV de ano para ano (Vega *et al.*, 2014).

Estratégias de replicação

O ciclo de replicação dos NoV, e dos restantes CV, assemelha-se bastante ao de outros vírus de RNA de polaridade positiva, podendo ser dividido em 10 etapas (Figura 6).

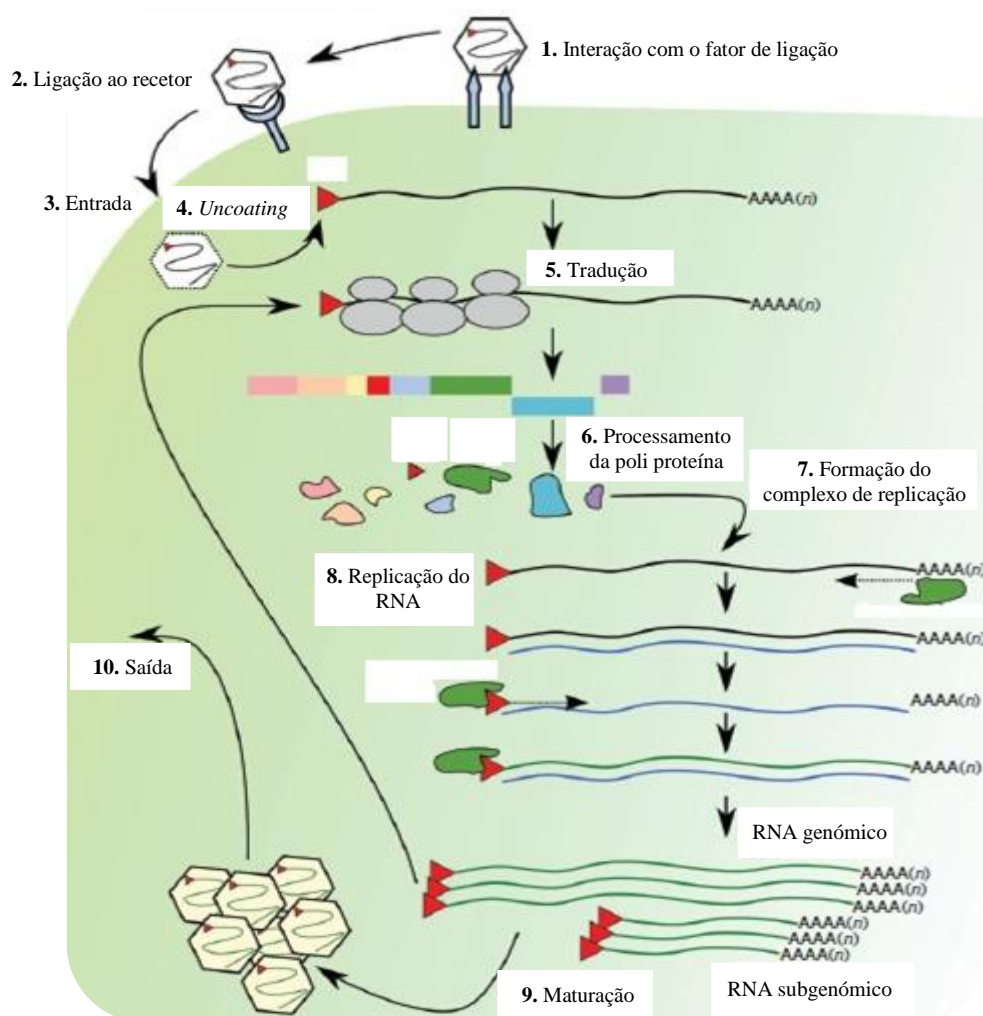


Figura 6: Ciclo de replicação dos NoV (adaptado de Thorne & Goodfellow, 2014). (1 e 2) Adesão das partículas virais à superfície celular; (3) entrada; (4) *uncoating*; (5) tradução; (6) processamento da poli proteína; (7) formação do complexo de replicação; (8) replicação do RNA, com subsequente obtenção do RNA genómico e subgenómico; (9) maturação; (10) saída das partículas virais da célula (Rohayem *et al.*, 2010; Thorne & Goodfellow, 2014).

A primeira etapa consiste na adesão das partículas virais à superfície celular, através de recetores específicos constituídos possivelmente por hidratos de carbono (Rohayem *et al.*, 2010; Thorne & Goodfellow, 2014). No caso dos NoV, vários investigadores defendem o envolvimento neste processo de um recetor de uma proteína, ainda desconhecido, que permite a ligação e a entrada do vírus na célula (Thorne &

Goodfellow, 2014). Após entrada, o processo de *uncoating* permite que o genoma viral fique apto para a tradução, que culmina na libertação das proteínas não estruturais, após processamento da poli proteína. Estas proteínas vão constituir o complexo de replicação, responsável pela síntese do RNA antígenômico, molde do RNA genômico e subgenômico, obtidos após replicação do RNA. O RNA genômico, recém-sintetizado, é utilizado como precursor da poli proteína, e depois traduzido no complexo de replicação, ou incorporado na cápside das partículas virais (Rohayem *et al.*, 2010; Thorne & Goodfellow, 2014). Em relação ao RNA subgenômico, este é traduzido em proteínas estruturais (VP1 e VP2) (Rohayem *et al.*, 2010). Após maturação, as partículas virais são por fim libertadas através da membrana plasmática (Rohayem *et al.*, 2010; Thorne & Goodfellow, 2014).

Porém, o mecanismo pelo qual os NoV entram na célula continua não totalmente elucidado. Apenas se sabe, com maiores certezas, que esse processo é dependente de dinaminas, ou seja, de grandes guanosinas-trifosfatases, e de colesterol (Thorne & Goodfellow, 2014).

Encontra-se comprovado que as VLP são capazes de interagir com diversas linhagens celulares, inclusive células intestinais humanas (células Caco-2), sendo que estas células têm a capacidade de internalizar algumas quantidades destas partículas (Murakami *et al.*, 2013).

Entretanto, após a descoberta dos recetores de HBGA para o vírus da doença hemorrágica dos coelhos, igualmente da família dos CV, iniciou-se o estudo dos recetores dos NoV com o seu protótipo, o NV, utilizando as VLP como ligando (Herbst-kralovetz, Mason, & Chen, 2010; Tan & Jiang, 2005).

Desde há cerca de 10 anos que se defende que os NoV também reconhecem os HBGA como recetores ou co-recetores na superfície celular, como outros patogêneos que usam outros hidratos de carbono como recetores, embora não haja por enquanto uma evidência direta entre a ligação destes vírus aos HBGA e a sua entrada na célula (Donaldson *et al.*, 2010; Herbst-kralovetz *et al.*, 2010; Miura *et al.*, 2013; Murakami *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2004; Tan & Jiang, 2005). Apenas se defende que os HBGA facilitam a infecção pelos NoV e posterior replicação celular (Kniel, 2014). Esta interação só é possível devido ao domínio P da proteína VP1, especificamente o subdomínio P2, que, por ser a região mais variável do genoma, se pensa ser o

responsável pela ligação entre a cápside destes vírus e os HBGA (Donaldson *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2004).

Quanto aos HBGA, das famílias ABO, Lewis e secretor, estes são complexos de hidratos de carbono, acoplados a glicoproteínas ou a glicolípidos, presentes nos eritrócitos e nas células da mucosa epitelial do trato respiratório, geniturinário e digestivo, ou como oligossacáridos livres em fluidos biológicos, como o caso do sangue e da saliva (Jin *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2004). A sua expressão resulta da adição de monossacáridos a precursores de antigénios pelas glicosiltransferases, dependentes de genes que determinam a via biossintética das 3 famílias acima referidas (Huang *et al.*, 2005; Ruvoën & Le Pendu, 2013; Tan *et al.*, 2004).

Nos seres humanos, 2 enzimas alfa-1,2-flucosiltransferases (FUT) participam na síntese desses antigénios, codificadas pelos genes FUT1 e FUT2 (Ruvoën & Le Pendu, 2013). Pensa-se então que os NoV têm a capacidade de reconhecer os HBGA presentes nas células de tecidos intestinais e saliva de secretores (Se⁺), ou seja, que expressam o gene FUT2, mas não de não-secretores (Se⁻), com o gene FUT2 inativo devido a mutações (Huang *et al.*, 2005; Kaufman, Green, & Korba, 2014; Rohayem *et al.*, 2010; Rydell, Kindberg, Larson, & Svensson, 2011). Por tudo isto tem sido sugerida uma correlação entre a suscetibilidade para a infeção pelos NoV, o estado secretor e a ligação aos HBGA (Herbst-kralovetz *et al.*, 2010). Contudo, trabalhos de investigação entretanto efetuados sugerem que as VLP dos NoV se ligam às células Caco-2 independentemente da expressão dos HBGA, propondo a participação de outras moléculas do recetor, como o sulfato de heparan, um glicosaminoglicano da membrana celular (Arias, Emmott, Vashist, & Goodfellow, 2013; Murakami *et al.*, 2013).

Patogénese

Devido à inability de crescimento dos NoV em laboratório, nenhuma cultura de células ou modelo de pequenos animais se encontram suficientemente desenvolvidos para o estudo das infeções associadas a estes vírus, e assim os dados existentes sobre a patogénese e fisiopatologia da doença provém de estudos realizados com recurso a voluntários humanos (Rydell *et al.*, 2011).

Num ensaio efetuado com recurso a 1000 voluntários, no qual foram realizadas biópsias ao jejuno proximal, foi identificado enfraquecimento e atrofia das vilosidades

intestinais, hiperplasia das células da cripta, vacuolizações citoplasmáticas e infiltração de células polimorfonucleares e mononucleares para a lâmina da mucosa que restou intacta (Glass *et al.*, 2009). Hodges & Gill (2010) registraram o mesmo fenómeno nas vilosidades intestinais, porém verificaram que a cripta se manteve inalterada (Figura 7).

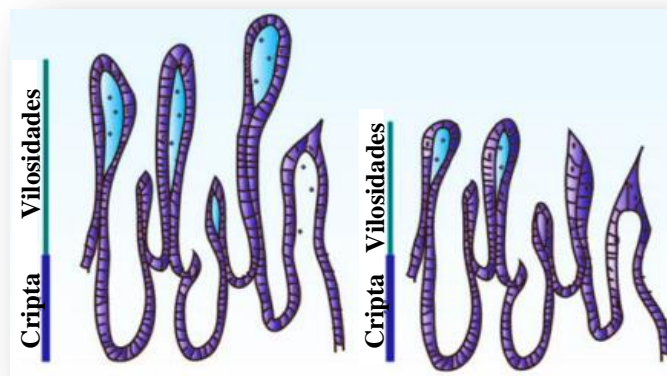


Figura 7: Atrofia das vilosidades intestinais associadas à infecção pelos NoV (Hodges & Gill, 2010).

No estudo referido por Rydell *et al.* (2011), constatou-se a infiltração de células T *cluster of differentiation* (CD) 8⁺, argumentando-se que o mecanismo de atrofia das vilosidades é dependente da ativação de linfócitos intraepiteliais. As lesões jejunais características foram igualmente visualizadas em voluntários que não adoeceram após inoculação dos NoV (Rydell *et al.*, 2011).

Neste estudo e no ensaio mencionado por Glass *et al.* (2009) não foram observadas quaisquer alterações histológicas no fundo gástrico e antro e mucosa do cólon (Glass *et al.*, 2009; Rydell *et al.*, 2011).

A extensão do envolvimento do intestino delgado não é conhecida e, por isso, o local de replicação destes vírus continua por identificar.

A atividade enzimática (fosfatase alcalina, sacarase e trealase) na borda em escova do intestino delgado é diminuída, resultando em esteatorreia leve e má absorção transitória de hidratos de carbono, assim como a atividade da adenilato ciclase no jejuno. Estas 2 alterações histológicas são atribuídas a mudanças na secreção de ácido clorídrico, pepsina e fator intrínseco.

Por fim, a motilidade e o esvaziamento gástricos encontram-se diminuídos, justificando as náuseas e vômitos associados à GEA (Glass *et al.*, 2009). Porém, Rydell *et al.* (2011)

afirmam que a secreção de ácido clorídrico, pepsina e fator intrínseco e a função motora gástrica parecem inalteradas durante a infecção. Por esta razão, pensa-se que, tal como no caso dos RV, os NoV têm a capacidade de ativar o sistema nervoso entérico, incluindo as aferentes serotoninérgicas e o nervo vago (Rydell *et al.*, 2011).

Quanto ao período de incubação dos NoV não há unanimidade. Os dados obtidos sugerem um mínimo de 8 a 10 horas e um máximo de 48 a 72 horas para o início dos sintomas associados à infecção (Glass *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2009; Wang & Deng, 2012; Weber, Rutala, Miller, Huslage, & Sickbert-Bennett, 2010).

A eliminação viral tem o seu pico 1 a 3 dias após o início da doença, sendo que a resolução dos sintomas ocorre em média 12 a 72 horas em adultos anteriormente saudáveis (Frange *et al.*, 2012; Weber *et al.*, 2010). Todavia, em situações limite, como crianças, idosos e imunocomprometidos, principalmente sujeitos a transplantes, a sintomatologia e a excreção viral podem prolongar-se durante semanas ou até mesmo anos, tornando a GE um caso crónico, principalmente nos 2 últimos casos referidos (Frange *et al.*, 2012; Glass *et al.*, 2009; Rydell *et al.*, 2011).

Os NoV mantêm-se infecciosos durante cerca de 2 semanas a 1 mês em superfícies e 2 meses em água (Fankem, Boone, Gaither, & Gerba, 2014; Hall, 2012; Lopman *et al.*, 2012). No que concerne à cápside do vírus, esta consegue preservar-se intacta durante mais de 3 anos (Lopman *et al.*, 2012).

Manifestações clínicas

As manifestações clínicas mais frequentes são o vômito, a diarreia aquosa, a febre baixa (37-39°C), as náuseas e as cólicas abdominais. Também são referidas dores de cabeça, calafrios e mialgias e, por vezes, diarreia sanguinolenta (Cangemi, 2011; Glass *et al.*, 2009; Weber *et al.*, 2010). Em geral, a diarreia é mais comum nos adultos e o vômito nas crianças (Moreno-Espinosa, Farkas, & Jiang, 2004).

Os imunodeprimidos, as crianças e os idosos podem apresentar sintomas mais graves, como desidratação, perda de peso, insuficiência renal, coagulação intravascular disseminada, diarreia crónica durante meses ou anos, desnutrição, cronicidade da doença e até mesmo morte (Bank-Wolf *et al.*, 2010; Koo, Ajami, Atmar, & DuPont, 2010).

Num ensaio referido por Glass *et al.* (2009), verificou-se que um terço dos voluntários eram portadores assintomáticos, ou seja, continham títulos de NoV nas amostras recolhidas mas não manifestavam qualquer sintomatologia característica.

Recentemente tem sido sugerida a associação entre a infeção pelos NoV e a enterocolite necrosante em recém-nascidos, encefalites, convulsões benignas e exacerbações da doença inflamatória aguda em pediatria (Bank-Wolf *et al.*, 2010; Glass *et al.*, 2009). Por outro lado, a síndrome do intestino irritável pós-infeciosa tem sido descrita como uma sequela da infeção por estes vírus (Koo *et al.*, 2010).

Vias de transmissão

De momento, admitem-se 3 modos de transmissão destes vírus na comunidade: através do contacto com pessoas (transmissão direta), pela via fecal-oral, ou superfícies infetadas (transmissão indireta); consumo de comida ou água contaminadas; e, menos conhecida, inalação oral de aerossóis do vômito (Glass *et al.*, 2009; Thornton, Jennings-conklin, & McCormick, 2004; Weber *et al.*, 2010). Todavia, durante as epidemias de NoV, várias vias de transmissão podem ser consideradas. Nos últimos anos têm sido detetadas um certo número de espécies de animais infetadas por estes microrganismos, o que levou a sugerir uma possível transmissão zoonótica e que um reservatório animal pode ser a fonte de introdução de novas estirpes, ainda em análise (Figura 8) (Mathijs *et al.*, 2012; Mesquita *et al.*, 2013).

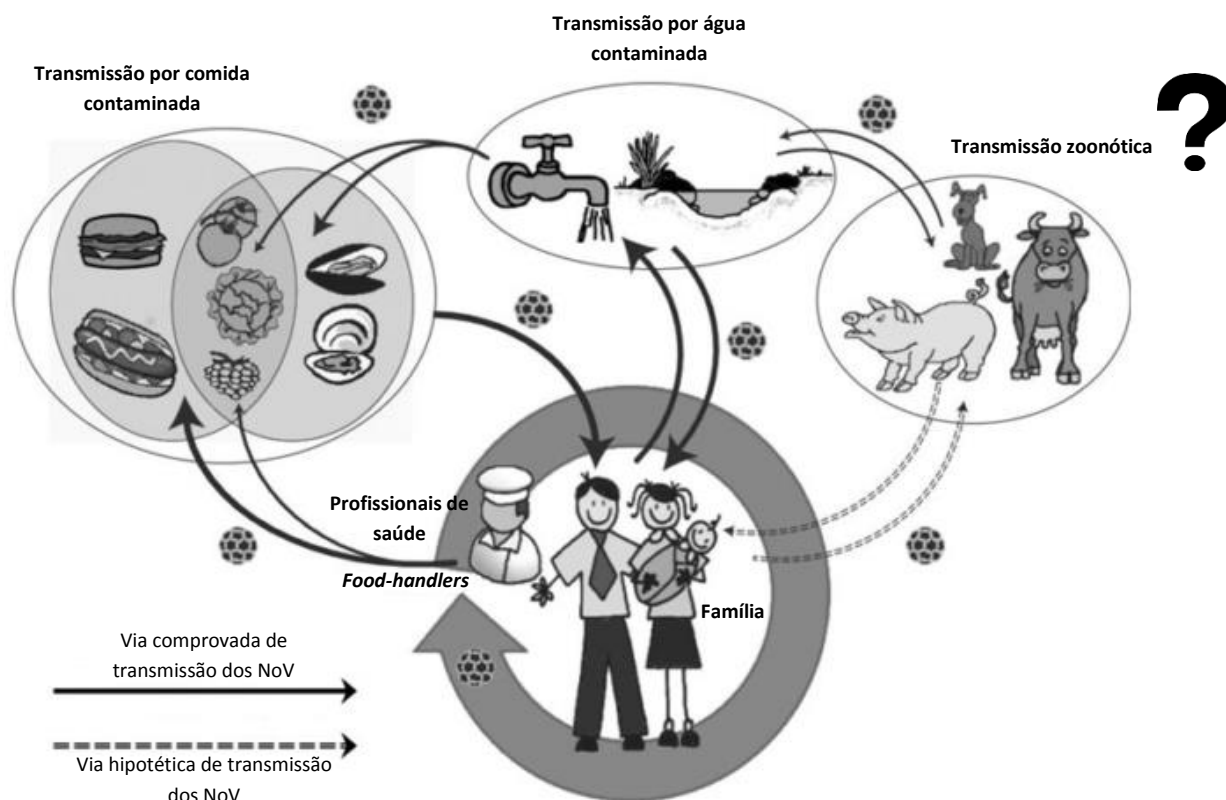


Figura 8: Representação esquemática de 2 vias de transmissão comprovadas dos NoV e da única via de transmissão hipotética, a zoonótica (adaptado de Mathijs *et al.*, 2012).

A transmissão dos NoV entre os seres humanos é facilitada por uma série de fatores. Em primeiro lugar a dose infecciosa baixa (entre 18 a 1000 partículas virais), que permite que o vírus se espalhe facilmente através de gotículas por objetos, entre pessoas e no meio ambiente, juntamente a uma libertação viral abundante (10^5 a 10^{11} cópias virais por grama de dejetos fecais) (Glass *et al.*, 2009; Hall, 2012; Rydell *et al.*, 2011). Depois, a eliminação fecal em infecções assintomáticas (Mathijs *et al.*, 2012). Apresenta uma excreção viral prolongada, que inclusive precede o início da doença, em mais de 30% das pessoas expostas, e que pode continuar durante bastante tempo após findar a sintomatologia, aumentando o risco de propagação secundária; particular atenção no que diz respeito aos *food-handlers* (em português, manipuladores de alimentos), profissionais de saúde e membros da mesma família, que protagonizam a via de transmissão humano-humano (Glass *et al.*, 2009; Mathijs *et al.*, 2012). Em quarto lugar, o vírus suporta baixas e altas temperaturas (como o congelamento e temperaturas pelo menos superiores a 60°C), é resistente a vários desinfetantes químicos comuns e persiste facilmente em superfícies ambientais, água e vários alimentos, como ostras, frutas e

legumes, irrigados pelos esgotos e comidos crus (Glass *et al.*, 2009; Hall, 2012; Mathijs *et al.*, 2012). Em quinto lugar, a grande diversidade dos NoV e a ausência de proteção cruzada completa e de imunidade a longo prazo levam a infecções repetidas ao longo da vida (Glass *et al.*, 2009; Hall, 2012). Por fim, o seu genoma sofre facilmente mutações, que culminam em mudanças antigénicas e fenómenos de recombinação, que por sua vez conduzem à sua evolução e aparecimento de novas estirpes que infetam hospedeiros suscetíveis (Glass *et al.*, 2009).

Efetivamente, os *food-handlers* e os profissionais de saúde, atendendo a que a via de transmissão dominante é o contacto pessoa-pessoa e que estes são capazes de expor um grande número de pessoas à doença, representam uma grande fonte de preocupação, principalmente os assintomáticos, uma vez que estes contribuirão em maior escala para a propagação destes vírus (Koo *et al.*, 2010; Zainazor *et al.*, 2010). As epidemias de infecções gastrointestinais devidas aos NoV associadas a esta via de transmissão têm sido amplamente descritas no que concerne a casas de repouso para idosos, navios de cruzeiro, hospitais, creches, festivais de música, colónias de férias, entre outros (Mathijs *et al.*, 2012). Na verdade, estima-se que 50% destes surtos nos EUA que apresentam como agente etiológico os NoV estejam relacionados com *food-handlers* doentes e que 20 a 40% das infecções hospitalares e afins derivem de infecções cruzadas através das mãos de profissionais de saúde (Weber *et al.*, 2010; Zainazor *et al.*, 2010).

Relativamente à ingestão de comida infetada, existem 2 tipos de contaminação: a primária, quando os alimentos são contaminados antes de serem colhidos, como os mariscos e frutos do mar ou frutos e vegetais cultivados ou irrigados com águas contaminadas; e a secundária, durante o momento da colheita ou na sua preparação, aumentando então a importância dos *food-handlers* nesta via de transmissão (Mathijs *et al.*, 2012; Zainazor *et al.*, 2010). Acrescentar apenas que o consumo de alimentos não previamente cozinhados, como carnes, frutos do mar, frutas e vegetais, constituem a causa da maioria das epidemias de GEA por contaminação deste tipo (Zainazor *et al.*, 2010).

Por último, a transmissão dos NoV através de águas infetadas é devida maioritariamente a descargas de material fecal humano, muitas vezes em águas utilizadas para irrigação de culturas. O posterior consumo pelo ser humano de água potável ou contacto com

águas de recreio contaminadas leva ao desenvolvimento deste tipo de infecção (Mathijs *et al.*, 2012).

Imunidade, suscetibilidade e resistência

Os mecanismos da resposta imune do hospedeiro à infecção devida à inoculação dos NoV são complexos e ainda por compreender (CDC, 2011; Lindesmith *et al.*, 2010). A inabilidade de cultivo e crescimento destes microrganismos em células, com a consequente inexistência de ensaios de neutralização *in vitro*, tem dificultado os estudos sobre a imunidade a estas infecções (CDC, 2011; Koo *et al.*, 2010).

Na suscetibilidade ou resistência à infecção por estes vírus admite-se que estas estarão dependentes da imunidade e predisposição genética do hospedeiro (Bull & White, 2011; Moreno-Espinosa *et al.*, 2004; Tan & Jiang, 2005).

De facto, os indivíduos infetados pelos NoV podem desenvolver imunidade adquirida, mas desconhece-se se esta é duradoura, inclusive para o mesmo genótipo dentro do mesmo genogruppo aquando de reinfeções (Lindesmith *et al.*, 2010; Lindesmith *et al.*, 2005). Alguns estudos têm relatado imunidade a curto prazo para estirpes homólogas; porém, os determinantes de uma imunidade a longo prazo continuam por clarificar (Bull & White, 2011; CDC, 2011; Koo *et al.*, 2010).

Dentro da imunidade adquirida, muitos dos estudos efetuados nos últimos anos têm tentado precisar se existe uma relação entre a pré-existência de anticorpos no soro e a aparente proteção exibida, e se alguma das linhagens dos NoV tem a capacidade de induzir proteção imunológica numa segunda inoculação com a mesma ou com uma diferente estirpe (Estes *et al.*, 2000). Em ensaios realizados com recurso a voluntários humanos, os indivíduos infetados por um destes vírus numa primeira fase eram suscetíveis à reinfeção pela mesma estirpe, bem como por estirpes heterólogas, dependendo do intervalo de tempo entre as 2 inoculações (CDC, 2011). Após inoculação de uma estirpe homóloga conseguiu-se comprovar a existência de uma imunidade a curto prazo, de 6 a 14 semanas, e a longo prazo, de 9 a 15 meses (Estes *et al.*, 2000; Moreno-Espinosa *et al.*, 2004). Todavia, verificou-se que após 27 a 42 meses a imunidade tinha findado, podendo os indivíduos serem mais tarde reinfetados pela mesma estirpe de NoV (Estes *et al.*, 2000; Glass *et al.*, 2009; Moreno-Espinosa *et al.*, 2004).

Estudos recentes constataram que a dose infecciosa necessária para provocar infecção gastrointestinal a 50% dos voluntários é de apenas 18 partículas infecciosas, muito superior à dose utilizada na maioria dos ensaios de imunidade efetuados (10^5 vezes superior), retirando credibilidade aos dados inicialmente obtidos. Posto isto, coloca-se a hipótese de que a proteção adquirida a nível humoral por uma dose inoculada menor pode ser substancialmente mais significativa, e fornecer ainda proteção cruzada, que a proteção concedida pela inoculação de uma dose maior (CDC, 2011; Glass *et al.*, 2009).

De encontro a estas dúvidas surge a evidência de que a pré-existência de anticorpos no soro contra os NoV permite a inibição da ligação entre as VLP e os HBGA, por acoplamento de anticorpos às VLP, que analogamente diminuirá o risco de exposição à infecção e à doença preconizadas por estes vírus (Atmar & Estes, 2012).

Koo e colaboradores (2010) são da opinião de que a diversidade antigénica dos NoV provavelmente intervém na resposta imune do hospedeiro e no limite de anticorpos que proporcionam proteção.

Pelos motivos referidos, os estudos nesta área continuam em curso (CDC, 2011; Glass *et al.*, 2009).

A imunidade celular desempenha um papel importante na identificação de infeções associadas a este grupo de vírus. Nos ensaios *in vitro*, antes da estimulação das células mononucleares do sangue periférico com as VLP, observou-se a depleção de células T CD^{4+} , com consequente diminuição significativa da produção de interferões (INF) gama. *In vivo*, os hospedeiros infetados apresentaram uma resposta imune predominantemente de células T *helper* 1, com um visível aumento na produção de IFN-gama e interleucinas-2. É de salientar que têm sido relatados casos de GE crónica e complicações severas, incluindo a morte, em recetores de transplantes alogénicos de células-tronco hematopoiéticas com imunossupressão humoral e celular infetados pelos NoV (Koo *et al.*, 2010).

Sobre a imunidade inata, esta tem sido implicada no controlo da infecção, apoiada por estudos efetuados com os NoV humano (HuNoV) e murino (MNV), este último considerado o substituto dos NoV mais adequado para a sua investigação. Os ensaios realizados nesta área demonstraram que o transdutor de sinal e ativador da transcrição celular 1 e os recetores celulares dos IFN deverão estar implicados no controlo do

aparecimento da doença clínica e disseminação dos vírus durante a infecção dos MNV *in vivo* (Thorne & Goodfellow, 2014).

Relativamente à imunidade, suscetibilidade e resistência à infecção associada à exposição aos NoV, em crianças observou-se que a incidência de GEA devida a estes vírus é aproximadamente 5 vezes superior em crianças de idades inferiores a 5 anos, em comparação com todas as outras faixas etárias (Lopman *et al.*, 2012). Crianças de idades inferiores a 6 meses apresentam tipicamente anticorpos contra os NoV pela presença de anticorpos maternos, no entanto estes não garantem proteção completa. Depois dos 6 meses de idade os níveis de anticorpos diminuem drasticamente e voltam a aumentar por volta dos 12 até aos 24 meses de idade, atingindo níveis de 90 a 100% em crianças mais velhas e adultos (Nurminen *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2009). Nurminen e colaboradores (2010) constatarem essas hipóteses em crianças infetadas entre os 7 e os 23 meses de idade, em que nesta faixa etária os níveis de anticorpos eram mínimos, em comparação a outras idades até aos 5 anos, estabelecendo uma correlação negativa entre a suscetibilidade a estes vírus e a quantidade de anticorpos pré-existentes. Especula-se assim que a sua inoculação antes dos 2 anos de idade crie proteção duradoura (Nurminen *et al.*, 2010). Da mesma forma, Sai e adjuntos (2013), igualmente num ensaio com crianças de idades inferiores a 5 anos, reportaram o maior número de episódios de GEA associados a estes vírus em crianças com idade média de 20 meses, equivalente ao menor título de anticorpos, em que após essa idade o desenvolvimento de imunidade protetora parece prevenir a reinfeção por estes microrganismos.

Ainda em relação à suscetibilidade à infecção, tem sido sugerido um mecanismo de proteção natural para alguns indivíduos, enquanto que outros embora infetados não apresentem qualquer sintomatologia. Esta evidente contradição tem sido relacionada com a descoberta de que fatores genéticos podem determinar a suscetibilidade do hospedeiro à infecção (Glass *et al.*, 2009). Esta hipótese surgiu pela primeira vez na década de 1970, após as seguintes observações efetuadas em ensaios com recurso a voluntários saudáveis: 1 – existência de indivíduos não infetados com o NV após o ensaio; 2 – pré-existência de anticorpos contra o NV que não se correlacionavam com a proteção fornecida no estudo; 3 – indivíduos com um maior número de anticorpos mais suscetíveis ao NV do que aqueles sem ou com níveis mais baixos de anticorpos (Tan & Jiang, 2005).

No que diz respeito à predisposição genética, esta estará relacionada com a expressão dos HBGA, os prováveis recetores destes vírus na superfície das células epiteliais da mucosa intestinal, em que diferentes estirpes reconhecem diferentes HBGA (Anstee, 2010; Koo *et al.*, 2010). A resistência à infeção tem sido associada a mutações no gene FUT2, que conduzem à ausência de expressão de HBGA (indivíduos Se^-), com consequente diminuição da suscetibilidade à infeção, ao contrário de indivíduos que produzem HBGA, denominados por Se^+ (Kaufman *et al.*, 2014; Koo *et al.*, 2010). Num ensaio coordenado por Lindesmith e colaboradores, num total de 77 voluntários inoculados com o NV 22 eram Se^- e os restantes 55 eram Se^+ . Dos 22 Se^- nenhum foi infetado após inoculação. De entre os 55 Se^+ 34 foram infetados, com sinais clínicos de infeção gastrointestinal, deteção dos vírus em amostras de fezes diarreicas e aparente resposta de anticorpos (Moreno-Espinosa *et al.*, 2004).

Huang e colegas de trabalho, através de um ensaio com recurso às VLP, antígenos recombinantes da cápside dos NoV, demonstraram que existem pelo menos 4 padrões de ligação ao recetor com base nas famílias ABO, *Lewis* e *secretor*. O protótipo NV, que representa um dos 4 padrões, é ligante dos tipos A e O de Se^+ , mas não do tipo B de Se^+ e Se^- . Os outros 3 padrões de ligação reconhecem os tipos A, B e O de Se^+ (estirpe VA387 do GII.4), A e B de Se^+ (estirpe MOH do GII.5) e *Lewis*-positivo de Se^+ e Se^- (estirpe VA207 do GII.9) (Huang *et al.*, 2005; Moreno-Espinosa *et al.*, 2004).

Em 2 estudos retrospectivos, citados por Moreno-Espinosa *et al.* (2004) e por Li *et al.* (2012), os voluntários com sangue do tipo O apresentaram um risco significativamente maior de contrair infeção em comparação aos indivíduos com outros tipos de sangue, principalmente do tipo B que exibiram o menor risco. Li *et al.* (2012) acrescentaram que presumivelmente os voluntários com sangue do tipo B nunca tinham sido infetados pelos NoV durante este ensaio porque não possuíam os recetores virais correspondentes no epitélio intestinal.

A importância do *status secretor* foi também documentada por Thorven e colaboradores, quando investigaram a suscetibilidade à GEA em doentes e profissionais de saúde envolvidos em epidemias desta doença causadas pelos NoV na Suécia. Os resultados demonstraram que apenas os doentes homozigóticos Se^- foram protegidos contra a sua inoculação. A grande diversidade destes vírus leva a admitir que algumas estirpes se

ligam a estruturas de indivíduos Se^- causando somente infeção assintomática (Anstee, 2010).

Dentro das estirpes predominantes sabe-se que o GI.1 (o NV) se liga preferencialmente às células O de Se^+ , enquanto que as estirpes epidémicas em todo o mundo do GII.3 e do GII.4 apresentam uma maior afinidade para as do tipo A de Se^+ (Flores & Okhuysen, 2009). Estas afirmações são discordantes com as observações de Jin *et al.* (2013) após 2 surtos de vírus dos genótipos 3 e 4 do GII em que os indivíduos Se^+ e Se^- apresentaram igual suscetibilidade à inoculação destes 2 vírus. Estas descobertas levantam a hipótese de que mutações que ocorreram entretanto em linhagens dos NoV poderão vir a alterar o público-alvo dos mesmos, permitindo que estes evitem a imunidade do hospedeiro (Jin *et al.*, 2013; Tan & Jiang, 2010).

O *status* secretor não explica completamente as diferenças observadas entre as pessoas infetadas e não infetadas para todas as estirpes. Assim, admite-se mais uma vez que os mecanismos adicionais de imunidade estarão provavelmente envolvidos, com necessidade de mais pesquisa nestas 2 áreas (CDC, 2011).

Uma vez que quase todos os HBGA humanos estão envolvidos na ligação dos NoV às células, os investigadores são da opinião de que todos os seres humanos podem ser infetados por estes vírus. Contudo, e como nem todas as linhagens se ligam aos HBGA, nem todos os NoV podem infetar todos os humanos (Moreno-Espinosa *et al.*, 2004).

Diagnóstico

A GE endémica, associada aos NoV, é auto-limitada, resolvendo-se em média em apenas 72 horas, não garantido exames laboratoriais para o diagnóstico do agente etiológico.

Porém, a recolha de amostras de indivíduos doentes torna-se essencial, quando colhidas o mais cedo possível após início da doença, para a investigação epidemiológica de surtos que envolvam várias pessoas. Na recolha de amostras para o fim citado o tempo, o número, a quantidade, o armazenamento e o transporte tornam-se fulcrais para um diagnóstico fiável de amostras suspeitas da presença de NoV (Tabela 1) (Thornton *et al.*, 2004).

Tabela 1: Etapas para a correta recolha e posterior diagnóstico de amostras suspeitas da presença de NoV (adaptado de Thornton *et al.*, 2004).

| Amostras | Considerações importantes |
|----------|---|
| Fezes | Recolha o mais breve possível, após início dos sintomas; |
| | Colheita preferencial do líquido de fezes diarreicas; |
| | Obtenção de amostras do maior número possível de indivíduos (superior a 10 indivíduos); |
| | Aquisição de amostras a granel (10 a 50 mililitros de fezes); |
| | Transporte em recipientes bem fechados para um laboratório de referência; |
| Vômito | Refrigeração a 4°C. |
| | Semelhante à recolha, tratamento e armazenamento de amostras de fezes. |
| Soro | Titulação de Imunoglobulina (Ig) G: verificação de um aumento de IgG superior em 4 vezes entre a fase aguda (nos primeiros 5 dias da doença) e de coalescência (do terceiro dia até à sexta semana); |
| | Ensaio de IgM: maior utilidade 10 dias após o início da doença ou quando apenas existe uma amostra de soro disponível. |
| Outras | Amostras de alimentos e água contaminadas devem ser submetidas a análise por reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR, do inglês <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>) para auxiliar na determinação da via de transmissão. |

A incapacidade de crescimento e cultivo dos NoV em culturas de células ou transferência para modelos animais também representa uma grande desvantagem para o seu diagnóstico (Moreno-Espinosa *et al.*, 2004; Thornton *et al.*, 2004; Wang & Deng, 2012).

Desde os primeiros testes para a identificação dos NoV em amostras de fezes, há 4 décadas, como a microscopia eletrónica, que exigia a presença superior ou igual a 10⁶ vírus por mililitro de fezes, grandes avanços se sucederam a nível da deteção e diagnóstico destes vírus, principalmente após a clonagem e sequenciação molecular do NV (Moreno-Espinosa *et al.*, 2004).

A primeira geração de ensaios para a sua deteção incluía a microscopia eletrónica (direta), imunomicroscopia eletrónica (indireta), imunoensaio de adesão por hemaglutinação e o *Western blot*, desenhados para utilizar reagentes de indivíduos anteriormente infetados, o que, conseqüentemente, os tornava inviáveis e difíceis de executar por escassa quantidade dos mesmos, e outras desvantagens que apresentam individualmente (Atmar & Estes, 2001; Moreno-Espinosa *et al.*, 2004).

A clonagem e sequenciação do genoma do NV, em 1990, e o desenvolvimento de protocolos de amplificação para diferentes regiões do genoma (denominadas regiões A

e B, pertencentes à ORF1, e regiões C, D e E, da ORF2) permitiram o aparecimento de uma segunda geração de ensaios baseados na deteção de antígenos dos NoV: o radioimunoensaio e os ensaios imunoenzimáticos (EIA, do inglês *enzyme immunoassays*) (Fioretti *et al.*, 2011; Moreno-Espinosa *et al.*, 2004; Thornton *et al.*, 2004). Estes progressos resultaram da possibilidade de obter a proteína da cápside do NV num sistema de expressão de Baculovírus, com consequente obtenção de VLP. As VLP têm desde então sido utilizadas como antígenos para detetar a resposta de anticorpos à infeção e para a produção de anticorpos mono e policlonais, ambos inseridos nos imunoensaios acima referidos (Atmar & Estes, 2001; Glass *et al.*, 2009).

Mais tarde surgiram técnicas para a deteção de ácidos nucleicos como a RT-PCR, considerada atualmente o método de referência para o diagnóstico dos NoV (Glass *et al.*, 2009; Koo *et al.*, 2010; Moreno-Espinosa *et al.*, 2004; Thornton *et al.*, 2004).

Efetivamente os EIA oferecem uma alternativa atraente para substituir os ensaios de deteção molecular mais caros e tecnicamente mais exigentes (CDC, 2011). No entanto, o desenvolvimento de um EIA amplamente reativo para os NoV, ou seja, com uma coleção mais abrangente de anticorpos de reação cruzada, tem sido difícil devido ao elevado número de estirpes antigenicamente bastante distintas (CDC, 2011; Glass *et al.*, 2009; Moreno-Espinosa *et al.*, 2004; Thornton *et al.*, 2004). Pelos motivos referidos esta técnica apresenta limitações, acrescentando o facto de requerer uma elevada carga viral para a obtenção de um sinal positivo (CDC, 2011). Para resolver estas questões, coloca-se a hipótese do emprego de um conjunto de anticorpos contra múltiplos tipos de antígenos, o uso de antígenos multivalentes com capacidade de imunização cruzada e/ou o isolamento de mAb contra epitopos potencialmente partilhados (Moreno-Espinosa *et al.*, 2004).

De momento existem vários *kits* comerciais disponíveis na Europa e no Japão, que incluem anticorpos mono e policlonais de reação cruzada, mas são pouco sensíveis (CDC, 2011; Glass *et al.*, 2009). Quando comparados entre si e com a RT-PCR, estes *kits* apresentam valores bastante discrepantes de sensibilidade e especificidade, de 36 a 80% e 47 a 100%, respetivamente, portanto menos sensíveis e menos específicos. Por este motivo não são recomendados para o diagnóstico clínico da infeção pelos NoV em casos esporádicos de GEA. Porém, os *kits* com alta especificidade (superior a 85%) e média sensibilidade (superior a 50%) podem ser úteis na triagem preliminar de várias

amostras de fezes associadas a epidemias de GEA. As amostras negativas têm de ser confirmadas por uma segunda técnica, como a RT-PCR, uma vez que estes *kits* não podem ser classificados como substitutos dos métodos moleculares durante as investigações destes surtos (CDC, 2011).

De entre os vários EIA e das técnicas disponíveis para o diagnóstico dos NoV, assume-se que o melhor método seria o ELISA (em inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*), por ser um ensaio rápido. Contudo, continua a ser menos sensível que a RT-PCR (Koo *et al.*, 2010).

Atualmente, com a técnica de RT-PCR, é possível identificar antígenos em número reduzido e em fezes colhidas 1 a 2 semanas após o início da doença (Thornton *et al.*, 2004). A sensibilidade deste ensaio depende dos *primers* (em português, sequências oligonucleótidas iniciadoras) utilizados, em que apenas alguns exibem a capacidade de amplificar uma gama mais ampla de genótipos de NoV (Koo *et al.*, 2010). Todavia, nenhum conjunto de *primers* abrange todas as estirpes, devido à alta variabilidade genética destes vírus (Koo *et al.*, 2010; Moreno-Espinosa *et al.*, 2004).

Este ensaio apresenta características bastante vantajosas relativamente aos demais. A capacidade de identificar as estirpes com precisão, devido à sequenciação de nucleótidos, e de detetar partículas virais em fezes de pacientes doentes em quantidades bastante reduzidas (como 100 partículas por mililitro), mesmo após findar a infeção, e em amostras de fezes armazenadas a 4°C, durante vários meses, e a -70°C, durante anos, são das mais relevantes (Thornton *et al.*, 2004; Wang & Deng, 2012). Por outro lado, apresenta algumas desvantagens: os ensaios necessitam de ser extremamente rigorosos, para que não sejam obtidos resultados falsos-negativos por contaminação entre espécies durante o teste, por isso poucos laboratórios estão aptos para estes tipos de análises; depois, este método de deteção pode ser limitado se estiverem presentes inibidores de amplificação, extração de RNA ineficiente e degradação do RNA dos vírus, por armazenamento de amostras em condições subótimas (Koo *et al.*, 2010; Moreno-Espinosa *et al.*, 2004; Thornton *et al.*, 2004).

A RT-PCR tem vindo a ser substituída pela RT-PCR em tempo real, que consegue ser mais sensível, por exibir uma melhor capacidade de identificação de um pequeno número de cópias de RNA viral, e rápida na deteção, uma vez que a confirmação subsequente dos genótipos dos NoV, através da separação da sonda hibridizada ou da

sequência de ácidos nucleicos, não é necessária neste tipo de RT-PCR; e fornece a confirmação e quantificação dos vírus num único ensaio, quando utilizada a sonda *Taqman* (Glass *et al.*, 2009; Koo *et al.*, 2010; Moreno-Espinosa *et al.*, 2004). Esta técnica em tempo real apresenta ainda uma maior especificidade, uma vez que a contaminação de DNA é menor que na convencional (Moreno-Espinosa *et al.*, 2004).

A RT-PCR e o ELISA têm sido utilizados concomitantemente para a identificação e quantificação dos NoV com excelentes resultados. Esta conjugação de técnicas é simples, economiza tempo e proporciona boas condições para a realização de estudos epidemiológicos em larga escala (Thornton *et al.*, 2004).

Em surtos, nos quais a análise microbiológica não é possível, os “critérios de Kaplan” têm sido utilizados com bastante sucesso para determinar a probabilidade de se tratar de um episódio de GEA causado pelos NoV. Têm como base critérios tanto epidemiológicos como clínicos estabelecidos por Kaplan e colaboradores, após exaustiva análise de 38 surtos de infecções gastrointestinais causados pelo NV entre 1976 e 1980 (Bank-Wolf *et al.*, 2010; Koo *et al.*, 2010). Estes critérios compreendem um período de incubação de 24 a 48 horas, duração média da doença de 12 a 60 horas, ausência de bactérias e/ou parasitas em amostras de fezes e vômitos em mais de 50% dos prováveis infetados. Outros sintomas, como febre, náuseas, cólicas e dores abdominais, são também considerados (Bank-Wolf *et al.*, 2010). Estima-se que tenham uma sensibilidade de aproximadamente 70% e uma especificidade até 99% no que diz respeito à distinção de episódios de GEA devidos aos NoV de outros microrganismos. Dada a baixa sensibilidade deste critério de diagnóstico, estes vírus não podem ser imediatamente excluídos como agentes etiológicos se as características do surto não cumprirem os “critérios de Kaplan” e se existir suspeita de ser causado por um enteropatogéneo viral (Koo *et al.*, 2010).

Na figura 9 encontra-se em esquema os passos a cumprir para ser possível a deteção dos NoV em amostras clínicas (fezes, vômitos e soro), de água, de alimentos e ambientais provavelmente contaminadas pelos mesmos.



Figura 9: Etapas necessárias à detecção dos NoV em amostras provavelmente contaminadas (adaptado de Atmar & Estes, 2001 e Stals *et al.*, 2012).

Epidemiologia

Os NoV são atualmente considerados a principal causa de surtos de GEA em todo o mundo, responsáveis por cerca de 50% de todos estes episódios e mais de 90% de infecções epidêmicas não-bacterianas, únicos vírus entéricos humanos capazes de causar pandemias de GEA (Eden *et al.*, 2014; Lopman *et al.*, 2012; Mai *et al.*, 2013).

Anualmente são atribuídas aos NoV cerca de 218 mil mortes, principalmente de crianças de idades inferiores a 5 anos e adultos com mais de 65 anos, e 1,1 milhões de hospitalizações em todo o mundo (Fioretti *et al.*, 2011; Hall, Wikswo, Pringle, Gould, & Parashar, 2014; Matthews *et al.*, 2012).

Nos EUA, onde os estudos sobre estes vírus emergentes estão mais bem documentados, estima-se que a cada ano ocorram 19 a 21 milhões de casos de infecções gastrointestinais, 1,7 a 1,9 milhões de consultas médicas, 400 mil atendimentos em serviços de urgência, 56 a 71000 hospitalizações e 570 a 800 mortes associadas à infecção pelos NoV (Hall *et al.*, 2014; Leshem *et al.*, 2013; Lopman *et al.*, 2012).

Estas epidemias ocorrem nos mais diversos locais, incluindo hospitais, casas de repouso para idosos, centros infantis, restaurantes e navios de cruzeiro, afetando os mais vulneráveis da comunidade, como os idosos, as crianças e os imunocomprometidos (Eden *et al.*, 2014; Lopman *et al.*, 2012).

De facto, a GEA é uma das principais causas de mortalidade infantil nos países em desenvolvimento. Os RV encontram-se firmemente estabelecidos como a principal causa de diarreia infantil grave a nível mundial; os NoV começaram recentemente a ganhar reconhecimento (Trainor *et al.*, 2013). Atualmente são dos agentes mais comumente identificados e os responsáveis pela hospitalização por GE grave de aproximadamente 12% das crianças de idades inferiores a 5 anos (Nahar *et al.*, 2013).

Tem-se verificado um aumento periódico de epidemias de NoV aquando do surgimento de novas estirpes, por provável evasão à imunidade populacional (Thongprachum *et al.*, 2014). De facto, nos anos em que os vírus do genótipo 4 do GII emergem verifica-se um aumento bastante significativo do número de casos de infeções gastrointestinais associados aos NoV, com necessidade de hospitalização em 50% das ocorrências (Lopman *et al.*, 2012).

As estirpes deste genótipo do GII supracitado são as mais prevalentes, tendo sido associadas a dezenas de epidemias e pelo menos 6 pandemias globais de GEA nos últimos 20 anos, usualmente devido ao aparecimento de novas variantes das mesmas a cada 2-4 anos, que substituem as variantes anteriormente dominantes (Eden *et al.*, 2014; Fioretti *et al.*, 2011; Leshem *et al.*, 2013; Mai *et al.*, 2013; Thongprachum *et al.*, 2014). Esta predominância sugere que o GII.4 tem uma melhor aptidão epidemiológica e maior taxa de evolução e mutação que todos os outros genótipos de todos os outros genogrupos (Lim *et al.*, 2013; Mai *et al.*, 2013).

As variantes do GII.4 notificadas incluem a “EUA 1995/1996” em 1996; a “Farmington Hills 2002” em 2002; a “Hunter 2004” em 2004; a “Minerva 2006b” e a “Den Haag 2006b” entre 2006 e 2008; a “New Orleans 2009” entre 2009 e 2012; e a “Sydney 2012”, identificada pela primeira vez na Austrália a março de 2012 e que em apenas 3 meses ultrapassou a variante “New Orleans 2009”, ainda predominante (Leshem *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2013; Thongprachum *et al.*, 2014). Outras variantes têm sido associadas a epidemias localizadas em regiões geográficas específicas, como a “Hunter 2004”, a “Osaka 2007” e a “Apeldoorn 2007” (Lim *et al.*, 2013).

Consente-se que as variantes “Sydney 2012” e “New Orleans 2009” apresentem regiões ORF1 diferentes mas ORF2 e ORF3 provenientes de um ancestral comum, a “Apeldoorn 2007”, sendo classificadas as variantes “Auckland 2010” e “Orange 2008” como linhagens da variante “Apeldoorn 2007”. A descoberta da “Auckland 2010” revelou que as formas pré-epidêmicas da “Sydney 2012” já estariam em circulação desde 2010. A identificação das chamadas variantes pré-epidêmicas reforça a importância de programas de vigilância epidemiológica, que ajudarão na identificação de novas variantes antes de se desenvolverem surtos generalizados da doença provocados pelas mesmas (Eden *et al.*, 2014).

Na verdade, no final de 2012, os sistemas de vigilância eletrônicos já existentes em muitos países, como no Reino Unido, na Holanda, no Japão, na Austrália, na França, na Nova Zelândia e nos EUA, de notificação de doenças infecciosas, de epidemias de GEA ou até mesmo específicos para reportar surtos devidos aos NoV, registraram um aumento dos níveis de atividade destes vírus em comparação a temporadas anteriores. Vários países associaram este aumento ao aparecimento da nova variante do GII.4 a “Sydney 2012” (Mai *et al.*, 2013; Thongprachum *et al.*, 2014).

Estas epidemias têm registros durante todo o ano, mas parece existir uma certa sazonalidade destas ocorrências para os meses de inverno, uma vez que cerca de 80% ocorrem entre novembro e abril (Leshem *et al.*, 2013).

A rápida identificação, investigações epidemiológicas e microbiológicas completas e implementação de medidas de controle eficazes são elementos chave para prevenir e controlar estes surtos e limitar o seu impacto sobre os locais mais frequentemente afetados e seus residentes (Barret *et al.*, 2014).

A. Infecção pelos NoV *versus* infecção pelos RV

De muitos microrganismos causadores de episódios de GEA os RV e os NoV sempre foram apresentados como os principais, podendo causar anualmente 1,5 milhões destas ocorrências que exigem visita hospitalar (Hemming *et al.*, 2013; Koo *et al.*, 2013; (Oldak *et al.*, 2009).

A visão sobre os NoV e a GEA mudou significativamente somente nas últimas décadas, com a introdução de métodos de detecção cada vez mais sensíveis e específicos, especialmente a RT-PCR em tempo real (Trainor *et al.*, 2013). Além disso, o número crescente de estudos moleculares e epidemiológicos de casos esporádicos e de epidemias desta doença mostram que os NoV são atualmente a causa mais comum da mesma, especialmente entre os mais novos e os mais velhos da comunidade (Oldak *et al.*, 2009; Trainor *et al.*, 2013).

Quanto a estudos nesta área, num hospital chinês, em 557 amostras em teste, colhidas entre 2007 e 2008, os NoV estavam presentes em 26,4% e os RV em 6,1% das amostras (Liu *et al.*, 2010).

Na Guatemala, de 2007 a 2010, procedeu-se à recolha de amostras de fezes de 2403 indivíduos com diarreia aguda que recorreram aos serviços de uma unidade hospitalar desse mesmo país. Verificou-se que a taxa de detecção dos RV nos doentes hospitalizados foi de 31% e dos NoV 22%, ao contrário dos doentes em ambulatório em que os NoV foram os vírus usualmente mais identificados (12%) seguidos dos RV (9%) (Estévez *et al.*, 2013).

Da análise microbiológica de 299 amostras de fezes, provenientes de surtos de GEA, ocorridos no norte de Itália, em 2009, associados a águas municipais contaminadas, somente 36 continham agentes bacterianos e/ou virais: 85%, correspondentes a 24 amostras, testaram positivo para a presença de NoV e 47,5%, ou seja 19 amostras, para os RV, sendo que destas 17 continham também títulos de NoV (Di Bartolo *et al.*, 2011).

Entre 2009 e 2010, nos EUA, foram notificados um total de 2259 surtos de infecções gastrointestinais, atribuídos à via de transmissão pessoa-pessoa, a um centro de notificação para este tipo de episódios. Dos 1419 com etiologia presente, 1270 (89%) foram devidos exclusivamente aos NoV e apenas 10 epidemias foram atribuídas aos RV (Wikswø & Hall, 2012).

No Bangladesh, em 2011, da recolha de amostras de fezes de 257 doentes hospitalizados com diarreia aguda, concluiu-se que os vírus predominantes foram os NoV (28,4%), imediatamente seguidos pelos RV (27,3%) (Nahar *et al.*, 2013).

Barret e colaboradores (2014), entre 2010 e 2012, em França, analisaram os surtos ocorridos em instalações de cuidados a longo prazo somente para idosos. Em 298

surtos, com agente etiológico definido, 73% foram atribuídos aos NoV, 19% aos RV e 4% à co-infecção NoV e RV.

A tabela 2 sintetiza a informação supracitada sobre a prevalência da infecção pelos NoV face à infecção pelos RV.

Tabela 2: Infecções gastrointestinais devidas aos NoV em comparação com as devidas aos RV.

| Autores | País e época em estudo | Amostras/surtos em análise | Percentagem de detecção dos NoV | Percentagem de detecção dos RV |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|--|---|
| Liu <i>et al.</i> (2010) | China, de 2007 a 2008 | 557 | 26,4% | 6,1% |
| Estévez <i>et al.</i> (2013) | Guatemala, de 2007 a 2010 | 2403 | Doentes hospitalizados: 22% Doentes em ambulatório: 12% | Doentes hospitalizados: 31% Doentes em ambulatório: 9% |
| Di Bartolo <i>et al.</i> (2011) | Itália, em 2009 | 36 | 85% | 47,5% |
| Wikswø & Hall, (2012) | EUA, de 2009 a 2010 | 1419 | 89% | 0,7% |
| Nahar <i>et al.</i> (2013) | Bangladesh, em 2011 | 257 | 28,4% | 27,3% |
| Barret <i>et al.</i> (2014) | França, de 2010 a 2012 | 298 | 73% | 19% |

Contudo, e o mais relevante, em 2006 a introdução no mercado das vacinas contra as estirpes mais comuns dos RV (a primeira dose administrada após as 6 semanas de idade e a segunda ou terceira doses até às 24 ou 32 semanas, respetivamente, dependendo da vacina pela qual se opta) teve como consequência uma redução substancial dos episódios de infeções gastrointestinais devidos a estes vírus e um aumento dessas mesmas ocorrências mas associadas aos NoV na população pediátrica (EMA, 2011, 2012; Green, 2014).

Nos EUA, nesse mesmo ano, foi aconselhada a imunização de todas as crianças contra os RV. As taxas de vacinação foram baixas, no entanto os casos de GEA associados a estes vírus diminuíram significativamente (entre os 60 e os 87%). Foram então analisadas as amostras de fezes de 8173 crianças de um hospital no Texas, entre fevereiro de 2002 e junho de 2010, portanto período pré e pós introdução das vacinas. A

idade média dos hospitalizados devido a episódios de GEA aumentou de 18,8 meses, entre 2002 e 2006, para, momento pós vacinação, 25,4 meses, entre 2007 e 2010. A detecção dos NoV variou de 5,6 para 16,8% entre 2002 e 2006 e de 12,1 para 14,9% entre 2007 e 2010 e a sua prevalência de 10,1% para 180,3% para todos os grupos pediátricos de idades inferiores a 60 meses nos 2 períodos de tempo referidos. A prevalência anual dos RV diminuiu de 14,6% no primeiro período referido para 5,2% entre 2007 e 2010, uma redução de quase 64% após comercialização destas vacinas (Koo *et al.*, 2013).

No Brasil, as vacinas contra os RV encontram-se incluídas no Programa Nacional de Imunização. Entre 2004 e 2009, os RV foram diagnosticados em 144 (29,6%) das 487 amostras recolhidas. Os NoV foram detetados em 26 (29,2%) das 89 amostras testadas para a sua presença. As infecções mistas de NoV e RV constavam em 2,2% das amostras, correspondente a 2 das 89 amostras. A vacinação contra os RV tem vindo a diminuir progressivamente a notificação de surtos associados a estes vírus: 35 em 2004, 24 em 2005, 35 em 2006, 8 em 2007, para nenhum em 2009 (Cilli *et al.*, 2011).

Na Finlândia, entre 2006 e 2008, período antes da introdução destas vacinas no Programa Nacional de Imunização finlandês, a cobertura da vacinação foi somente de 30%, tendo-se verificado que os RV representavam 52% e os NoV 25% de todas as ocorrências de infecções gastrointestinais registadas num espaço hospitalar deste país. A 1 de setembro de 2009 foi finalmente incluída nesse programa, atingindo de imediato valores de abrangência à volta dos 90%, e mais tarde os 95 a 97%. Desde essa data até 31 de agosto de 2011 foram reunidas amostras de fezes de 330 crianças com sintomas de GEA: 26% continham títulos de RV, uma redução de 50% relativamente ao período designado por pré-programa, e 33,6% foram positivas para a presença de NoV, que passaram a ser considerados os agentes predominantes no que diz respeito à etiologia deste tipo de infeção (Hemming *et al.*, 2013). Concluiu-se ainda que as vacinas contra os RV não apresentam qualquer efeito a nível da redução dos casos de GEA associados aos NoV, ao contrário do que parece acontecer com os Adenovírus e com os SV (Hemming *et al.*, 2013; Wikswo *et al.*, 2013).

Nos EUA, procedeu-se à análise das amostras de fezes de 1295 crianças, de idades inferiores a 5 anos, hospitalizadas em algum momento entre 2009 e 2010, com e sem sintomatologia clínica, estes últimos considerados casos-controlo, de infeção

gastrointestinal. Em crianças sintomáticas os NoV foram identificados em 21% das amostras e os RV em 12%; nas crianças aparentemente saudáveis 4% das amostras continham títulos de NoV e quantidades inferiores a 1% de RV; 5 crianças apresentaram co-infecção dos 2 vírus referidos (Payne *et al.*, 2013).

Num ensaio realizado em Nicarágua (EUA), com 330 crianças, entre setembro de 2009 e outubro de 2010, constatou-se que os NoV foram os agentes etiológicos de 24% dos casos de GEA, seguidos dos SV (17%) e só depois dos RV (8%), concluindo-se que a aplicação das vacinas permitiu que os grandes responsáveis pela maioria dos episódios de diarreia viral passassem a ser os NoV (Bucardo, Reyes, Svensson, & Nordgren, 2014).

Em Portugal, as vacinas contra os RV encontram-se igualmente disponíveis desde 2006 no mercado privado, ou seja, não abrangidas pelo Programa Nacional de Vacinação (Cancelinha *et al.*, 2013). Porém, a investigação de Rodrigues e co-autores (2007) constatou que as ocorrências de GEA causadas pelos RV diminuíram de 49% em 2006 para 25,7% em 2009.

Em 2009, num estudo que reuniu 1071 crianças, com sintomas clínicos de infeção gastrointestinal, foram recolhidas 371 amostras de fezes. Os agentes mais detetados foram os RV (24%) e logo de seguida os NoV (13%) (Cancelinha *et al.*, 2013).

Entre 2011 e 2012, na área de Lisboa, foi efetuada a análise de 140 amostras de fezes de crianças com diagnóstico de GEA em 2 centros hospitalares. Os microrganismos mais identificados foram os RV (26,4%) e os NoV do GII (13,6%) (Escobar *et al.*, 2013).

Igualmente no mesmo período, na mesma área geográfica, com crianças internadas pelos mesmos motivos mas em 2 hospitais diferentes do estudo anterior, os RV e os NoV apresentaram percentagens de infeção muito semelhantes: 39,2 contra 32,4%, respetivamente, em 182 amostras de fezes recolhidas (Costa *et al.*, 2013).

Por último, e o mais discrepante, da observação de amostras de fezes de 45 crianças até aos 15 anos com sintomas de diarreia aguda, internadas em 2 hospitais na área de Lisboa, de maio a setembro de 2011, 53% foram positivas para a presença de NoV e 40% para os RV (Costa *et al.*, 2011).

A tabela 3 contém em suma os ensaios anteriormente dispostos sobre a prevalência dos RV em relação aos NoV, após introdução no mercado das vacinas anti RV.

Tabela 3: Episódios de GEA associados aos NoV em comparação com os associados aos RV, após recomendação da vacinação anti RV dos recém-nascidos.

| Autores | País e época em estudo | Amostras/surtos em análise | Percentagem de detecção dos NoV | Percentagem de detecção dos RV |
|---------------------------------|--|-----------------------------------|--|--|
| Koo <i>et al.</i> (2013) | EUA, de fevereiro de 2002 a junho de 2010 | 8173 | Entre 2002 e 2006: 5,6 a 16,8%; Entre 2007 e 2010: 12,1 a 14,9% | Entre 2002 e 2006: 14,6%; Entre 2007 e 2010: 5,2% |
| Cilli <i>et al.</i> (2011) | Brasil, de 2004 a 2009 | 487 | 29,2% | 29,6% |
| Hemming <i>et al.</i> (2013) | Finlândia, de 2006 a 2008 | 330 | Pré-programa: 25% Pós-programa: 33,6% | Pré-programa: 52% Pós-programa: 26% |
| Payne <i>et al.</i> (2013) | EUA, de 2009 a 2010 | 1295 | Doentes sintomáticos: 21% Doentes assintomáticos: 4% | Doentes sintomáticos: 12% Doentes assintomáticos: inferior a 1% |
| Bucardo <i>et al.</i> (2014) | EUA, de setembro de 2009 a outubro de 2010 | 330 | 24% | 8% |
| Cancelinha <i>et al.</i> (2013) | Portugal, em 2009 | 371 | 13% | 24% |
| Escobar <i>et al.</i> (2013) | Portugal, de 2011 a 2012 | 140 | 13,6% | 26,4% |
| Costa <i>et al.</i> (2013) | Portugal, de 2011 a 2012 | 182 | 32,4% | 39,2% |
| Costa <i>et al.</i> (2011) | Portugal, de maio a setembro de 2011 | 45 | 53% | 40% |

B. Sazonalidade dos NoV

A sazonalidade destas infecções pode ser definida como o “aparecimento de epidemias recorrentes em períodos definidos do ano” (Rohayem, 2009). As baixas temperaturas, a

redução da imunidade da população, o aparecimento de novas variantes bem como, mais recente, a ocorrência de chuvas, talvez devido à transmissão por água contaminada, têm sido associados ao aumento da atividade destes microrganismos.

Numa revisão da literatura existente sobre esta temática, dos 68 surtos analisados 41,2% aconteceram durante os meses de inverno (de dezembro a fevereiro no hemisfério norte e de junho a agosto no hemisfério sul) e 71% nos meses de frio (de outubro a março no hemisfério norte e de abril a setembro no hemisfério sul). A maioria dos picos ocorreu de dezembro a fevereiro ou então somente no mês de março. A sazonalidade dos NoV pareceu estar intimamente relacionada com o mês mais chuvoso do ano. Na Europa, o pico das infecções provocadas pelos NoV foi claramente observado durante os meses de inverno. Os dados existentes sobre o hemisfério sul não mostram qualquer sazonalidade nessa zona do globo. De momento, a tendência das infecções devidas a estes agentes continua a ser para os meses mais chuvosos e não mais frios. De acordo com os autores, os NoV tendem a ser um fenómeno de inverno, pelo menos para o hemisfério norte temperado.

Curiosamente existe uma associação entre a taxa de natalidade e o padrão de sazonalidade dos NoV: são inversamente proporcionais, assim como verificado para os RV, por aumento do número de indivíduos suscetíveis (Ahmed, Lopman, & Levy, 2013).

Em conclusão, sobre esta temática existem várias observações.

De acordo com Sai e colaboradores (2013), a infecção devida aos NoV foi mais significativa nos meses de setembro a novembro; contudo, no estudo de Harris e adjuntos (2008), os surtos ocorreram mais frequentemente entre os meses de outubro e março, com inesperados aumentos de atividade nos meses de verão. Hall e colegas (2014), nos EUA, verificaram que as epidemias de NoV foram mais frequentes no inverno, com 2394 (55%) surtos durante dezembro e fevereiro, em que 398 (39%) foram de origem alimentar e ocorreram principalmente entre dezembro e fevereiro, em comparação com os 1996 surtos (60%) por outras vias.

Na verdade, em 2 estudos, um na Austrália e o outro na Tailândia, constatou-se que o pico de atividade dos NoV tem-se registado muito variável pelo menos nestes últimos

anos, uma vez que foi registado um aumento de ocorrências entre os meses de agosto e dezembro e entre maio e junho (Chaimongkol *et al.*, 2014; Eden *et al.*, 2014).

Mas por que motivo as infeções gastrointestinais causadas pelos NoV não findam antes do verão?

De acordo com Dowell e colaboradores, citados por Rohayem (2009), a sazonalidade dos NoV está dependente de 3 fatores: aparecimento e desaparecimento, alterações ambientais e mudanças no comportamento do hospedeiro.

Sobre o primeiro, estes picos de GEA registados no verão podem estar relacionados com a circulação limitada destes vírus nesta época, sinónimo da sua sobrevivência a longo prazo na população hospedeira e reativação sazonal. No que concerne a esta hipótese existem alguns argumentos a favor: os NoV causam doença auto-limitada, com duração de 24 a 48 horas em doentes aparentemente saudáveis, porém a excreção destes vírus dura em média até 4 semanas após o fim da infeção; e a eliminação viral ocorre em cargas muito elevadas. Estas 2 premissas fazem com que os NoV sejam transmitidos de forma eficiente e silenciosa (assintomática) a indivíduos não infetados. Além disso, a evolução a cada 2-4 anos concede aos NoV a capacidade de persistirem em populações humanas, permitindo ainda a evasão à imunidade do hospedeiro através da derivação antigénica em populações pouco desenvolvidas.

Sobre o segundo, as mudanças a nível climático poderão vir a modular a epidemiologia e, portanto, a mortalidade e morbilidade de doenças infecciosas virais. Tem-se verificado que as condições ambientais, tais como humidade, ciclos de temperatura e padrões de vento e chuva, estão associadas à sazonalidade dos NoV. A humidade do ar, acima de valores considerados normais em determinadas regiões, pode facilitar a sua transmissão pelos aerossóis, neste caso específico o vômito, por aumento da eficiência na transmissão dos viriões. Exibem ainda uma forte resistência a temperaturas mais baixas, incluindo em águas.

Para finalizar, e relativamente ao comportamento do hospedeiro, a aglomeração das populações é frequentemente invocada para explicar o aumento do contágio e incidência posterior de doenças infecciosas e os NoV não são exceção, uma vez que são registados um maior número de ocorrências em período escolar, em hospitais e navios de cruzeiro, por exemplo. Outra mudança curiosa no hospedeiro é a diminuição da vitamina D

durante o inverno, que pode condicionar a doença derivada da infecção pelos NoV, por consequente diminuição da resposta imune, apenas especulativa (Rohayem, 2009).

Efetivamente, os cenários climáticos e modelos preveem grandes alterações a nível mundial: a nível da precipitação e da temperatura terrestre, ocorrência de eventos climáticos extremos e aumento do nível do mar são aguardados. Como consequência, poderão esperar-se efeitos diretos sobre a carga viral de várias doenças infecciosas em águas de consumo e de recreação e na própria transmissão dos vírus por esta via (Sterk, Schijven, Nijs, Maria, & Husman, 2013).

C. Grupos de risco

De momento, e devido a vários fatores subjacentes, as crianças, principalmente de idades inferiores a 5 anos, os idosos, preferencialmente de idade superior ou igual a 60-65 anos, e os indivíduos imunocomprometidos, tanto adultos como crianças de todas as idades, são considerados os 3 grandes grupos de risco, por apresentarem uma maior suscetibilidade de complicações mais graves aquando da invasão do organismo pelos NoV (Green, 2014; Herbst-kralovetz *et al.*, 2010; Karst, 2010).

No que concerne ao primeiro grupo de risco, foram recolhidas amostras de fezes de 1295 crianças, de idades inferiores a 5 anos de idade, com e sem sintomatologia clínica de GEA, entre 2009 e 2010 nos EUA. Em crianças sintomáticas, os NoV foram identificados em 21% das amostras; nas crianças aparentemente saudáveis em 4% das amostras. A média de idades para a infecção devida a estes vírus foi de 17 meses. Das amostras que puderam ser genotipadas 97% eram pertencentes ao GII e somente 3% ao GI. No caso das crianças sintomáticas, em 2009 a variante “Minerva 2006b” do GII.4 foi a mais frequentemente detetada (71%), seguida do GII.12 e do GII.3, das variantes do GII.4 “New Orleans 2009” e “Yerseke 2006”, do GII.6, do GII.7, do GII.14 e do GII.21; em 2010 a variante do GII.4 mais detetada foi a “New Orleans 2009” (35%), e depois os genótipos 12 (21%), 13 (16%) e 1 (12%) do GII e, em significativas menores quantidades, o GI.6, o GI.7, o GII.2, o GII.3, o GII.6 e o GII.7. Nas crianças assintomáticas, somente em 2009 foi realizada a genotipagem, onde se observou a predominância da variante “Minerva 2006b” (45%) seguida pelos GI.4, GII.3, GII.6 e GII.12 (Payne *et al.*, 2013).

No Japão, foram colhidas 2381 amostras de fezes de recém-nascidos até adolescentes de 15 anos de idade, com sintomas clínicos de infecções gastrointestinais, não hospitalizados em clínicas pediátricas, de julho de 2009 a junho de 2013. Foram divididos em 7 faixas etárias: idade inferior a 6 meses (213 amostras), 6 a 11 meses (673 amostras), 12 a 23 meses (829 amostras), 24 a 35 meses (334 amostras), 36 a 47 meses (113 amostras), 48 a 59 meses (63 amostras) e superior a 60 meses de idade (156 amostras). Os NoV foram os microrganismos notoriamente dominantes (39,3% das amostras). Durante os 4 anos de estudo a predominância das estirpes do GII não foi constante: em 2009-2010 40,8%, em 2010-2011 40,1%, em 2011-2012 31,8% e em 2012-2013 43%. Foram identificados 9 genótipos do GII: 4 (71,4%), 3 (13,1%), 2 (6,5%), 14 (4,4%), 7 (1,4%), 6 (1,3%), 13 (1,1%), 12 (0,8%) e 17 (0,1%). Os vírus do GI foram detetados em apenas 0,3% das amostras analisadas, com o genótipo 6 do GI a ser o prevalente (0,25%), seguido do GI.1 e do GI.4 na mesma proporção (0,04%). Registaram-se casos de co-infecção de RV e NoV. 3 variantes do GII.4 foram identificadas nas amostras coletadas: “Den Haag 2006b” (43,2%), “New Orleans 2009” (17,8%) e, a mais recente variante, “Sydney 2012” (36,4%). Outras variantes foram detetadas mas em proporções muito inferiores. A “Den Haag 2006b” foi predominante até março de 2012, em co-circulação com a “New Orleans 2009”. Posteriormente, ambas foram gradualmente substituídas pela “Sydney 2012”, descrita a partir de junho de 2012, responsável por 85,7% das epidemias registadas causadas pelos NoV. A idade média dos doentes foi de 22,4 meses. Os NoV foram maioritariamente identificados em bebés e crianças entre os 12 e os 23 meses (42,4%), depois entre os 6 e os 11 meses (25,6%), 24 e 36 meses (14,9%), menos de 6 meses (6,3%), 36 e 47 meses (4,5%), mais de 60 meses (3,5%) e entre os 48 e 59 meses (1,1%). De encontro a outros estudos, também aqui se verificou que a faixa etária mais afetada são as crianças de idades inferiores a 2 anos, especialmente as com idades compreendidas entre os 12 e os 23 meses, possíveis causas já citadas (Thongprachum *et al.*, 2014).

Na Dinamarca, entre 2006 e 2010, foi detetada uma forte associação entre a infeção pelas estirpes do GII.4 e a idade superior ou igual a 60 anos, principalmente em locais de cuidados de saúde, inclusive lares de idosos, e secundariamente em ambientes comunitários. De facto, os vírus deste genótipo do GII foram responsáveis por cerca de 90% dos episódios de GEA registados em doentes com idade superior ou igual a 60 anos e 40% das crianças de idades inferiores a 3 anos nos ambientes analisados. Em

ambientes de cuidados de saúde as estirpes do GII.4 foram as mais prevalentes (91%) assim como em locais comunitários (54%). Estes resultados são consistentes com os dados obtidos nos EUA, em que 84 a 87% das epidemias ocorridas em hospitais e centros de cuidados de longa duração foram causados pelo GII.4, em comparação a 17 a 75% em outros locais. Esta situação tem estado em debate, onde têm sido implicadas as características dos doentes, como doenças concomitantes ou idade avançada. Na verdade, Veja e colaboradores, referenciados neste estudo, relataram que a idade avançada dos doentes estaria associada a surtos do GII.4 em diversos ambientes. Noutros estudos tem sido demonstrado que a sintomatologia característica de episódios de GEA devidos aos NoV neste grupo é mais severa, mas de duração normal, quando implicada uma estirpe do GII.4. Nos recém-nascidos, os infetados com os vírus deste genótipo do GII apresentam uma infeção mais duradoura, contrastando com as evidências referidas anteriormente no caso dos idosos, porém esta observação está dependente do seu fraco sistema imunitário. Contabilizaram-se mais mortes e hospitalizações em epidemias associadas ao GII.4 do que a outros genogrupos ou genótipos. Constatou-se ainda que o GII.3 é mais prevalente nas crianças do que nos adultos (Franck, Fonager, Ersbøll, & Böttiger, 2014).

Especificamente sobre os idosos, numa investigação efetuada entre 1999 e 2007 na Holanda, a partir de uma base estatística com informações sobre surtos de GEA desencadeados pelos NoV, os doentes em análise foram divididos em 3 faixas etárias: 65 a 74 anos, 75 a 84 anos e superior ou igual a 85 anos. As mortes registadas foram maioritariamente da faixa etária dos indivíduos de idade superior ou igual a 85 anos, com picos coincidentes com o surgimento de novas variantes dos NoV, com início em 2002-2003, até 550 mortes associadas aos NoV em 2006-2007 (van Asten *et al.*, 2012).

Nos EUA são notificados, a instituições públicas de saúde, cerca de 1000 surtos de GEA por ano em locais de repouso para idosos, muito provavelmente em subnotificação. Os NoV têm sido implicados em 86% dos episódios com etiologia confirmada. Os relatórios epidemiológicos têm sugerido que estas ocorrências podem levar à hospitalização e/ou morte, particularmente entre os idosos, com estimativas de letalidade entre os 0,01 e os 0,5%. De facto, 90% das cerca de 800 mortes relatadas por ano nos EUA são atribuídas a indivíduos com idade superior ou igual a 65 anos.

Na observação efetuada por estes autores, os dados utilizados, relativos somente a lares de idosos, foram obtidos de um sistema de notificação dos EUA, entre 2009 e 2010. No total dos 2 anos de estudo foram comunicadas 67730 hospitalizações e 26055 mortes e durante os períodos de surto foram registadas 1097 mortes e 2533 hospitalizações. Os residentes de idade superior a 90 anos foram sujeitos a um maior número de hospitalizações e taxa de mortalidade (Trivedi *et al.*, 2012).

Por último, os NoV podem estabelecer infeção persistente em indivíduos imunodeprimidos, resultando em excreção viral prolongada e doença gastrointestinal, que, a longo prazo, se pode tornar gradualmente debilitante e um risco eminente para a vida.

Numa revisão de 123 mortes atribuídas aos NoV, uma condição subjacente grave foi relatada em 17 indivíduos no momento da morte, com 10 (58%) das mortes registadas em doentes imunocomprometidos, pela quimioterapia ou sujeitos a transplantes. Nos primeiros estudos sobre a diversidade genética dos NoV, a estirpe “Toronto”, atualmente considerada variante de referência do GI.3, foi identificada em doentes pediátricos a receberem cuidados num hospital de Toronto, no Canadá. 4 destes 11 doentes foram designados como imunodeprimidos, com condições subjacentes de leucemia, pós-transplante de fígado ou imunodeficiência combinada grave.

Desde então, um número crescente de ocorrências em crianças caracteristicamente em imunodepressão com outro tipo de patologias, e não apenas sintomatologia clínica de GEA, tem sido associado à infeção causada pelos NoV, como distúrbios hereditários imunes, transplante do intestino delgado, renal ou de células-tronco hematopoiéticas e com cancro ou durante o seu tratamento.

A primeira análise sistemática sobre a prevalência dos NoV em crianças com deficiências imunológicas hereditárias constatou que estes foram os microrganismos mais frequentemente identificados nas 62 crianças em estudo, com 57,1% das amostras de fezes positivas 9,5 meses depois, e portanto excreção claramente continuada.

Num outro ensaio, na área da pediatria, de todos os doentes com pneumatose intestinal 63% eram imunocomprometidos, em que os NoV foram classificados como patogéneos predominantes (23,5%), após triagem para agentes bacterianos e virais. Numa avaliação retrospectiva de excreções de fezes diarreicas de 55 doentes de idades inferiores a 21

anos, sujeitos a transplante de células estaminais hematopoiéticas, verificou-se que dos 49 doentes que desenvolveram diarreia 8 (6,3%) continham títulos de NoV nas amostras recolhidas.

Numa outra pesquisa, em 2 hospitais pediátricos de Atlanta, os NoV foram detetados em 15 das 92 (16,3%) amostras de fezes dos doentes em teste. 11 das 15 amostras (73,3%) pertenciam a crianças imunodeprimidas, estimando-se assim uma prevalência geral de infeções devidas aos NoV neste grupo de 23,4%.

No que diz respeito a adultos imunodeprimidos, a infeção crónica causada pelos NoV tem sido documentada após transplante de células-tronco hematopoiéticas, transplante renal, transplante cardíaco, infeção pelo vírus da imunodeficiência humana e com cancro ou durante o seu tratamento.

A população idosa apresenta risco aumentado para um desfecho mais severo de doenças infecciosas, incluindo a doença provocada pela exposição aos NoV, com o declínio da função imune a ser um provável fator contribuinte.

Os únicos genótipos identificados em indivíduos imunodeprimidos, de todas as idades, nos surtos anteriormente descritos foram o 3, o 4 e o 7 do GII (Green, 2014).

D. Infeção pelos NoV em todo o mundo

Da análise de 250 artigos, com 902 epidemias de GEA associadas aos NoV, entre dezembro de 1993 e março de 2010, foram contabilizados 896 surtos com o ano de ocorrência documentado. 71% sucederam-se entre 2000 e 2010, mais de 90% decorreram no hemisfério norte e 45% durante o inverno. Dos 754 episódios que assinalavam o genogrupa, o predominante foi o GII (75%), seguido do GI (13%) e depois do GI juntamente com o GII (12%). Os vírus do GII e seu genótipo 4 foram os mais associados a surtos em instalações de saúde, sendo que inclusive os vírus do GII.4 foram considerados os responsáveis por um terço de todas as ocorrências registadas (Matthews *et al.*, 2012).

Relativamente a Desai e colegas (2012), estes analisaram 843 surtos de infeções gastrointestinais derivadas da invasão de hospedeiros suscetíveis pelos NoV, concentrados em 233 artigos publicados a partir de 45 países, entre janeiro de 1993 e junho de 2011. 66% foram registados em ambientes comunitários e 26% em serviços de

saúde. 44% tiveram origem em alimentos ou águas contaminados e somente 16% foram associados à via de transmissão pessoa-pessoa. Quanto à predominância de estirpes, 35% foram causados por vírus não pertencentes ao GII.4 e 22% por vírus correspondentes ao genótipo e genogrupo referidos. Registaram-se 219 epidemias em serviços de saúde, 112 em instituições de cuidados de longa duração e 107 em hospitais. O número de hospitalizações e mortes foram apurados em 82 e 47 surtos, respetivamente. Com base em 71724 casos (69857 em ambientes não hospitalares), foram contabilizadas 501 hospitalizações e 45 mortes, estimando-se a taxa de hospitalização e morte em 54 (0,7%) e 6 (0,07%) pessoas por cada 10 mil indivíduos infetados, respetivamente. As taxas de hospitalização e mortalidade foram mais elevadas em surtos que decorreram em unidades de saúde do que nos desenvolvidos em ambientes comunitários; em epidemias provenientes da infeção pelos vírus do GII.4 do que derivadas de vírus não pertencentes a este genótipo do GII, excluindo as infeções mistas; e, similarmente, em surtos devidos ao modo de contágio pessoa-pessoa do que associados à via de transmissão comida e/ou água contaminadas. Nas altas taxas de internação em unidades de cuidados a longo prazo e mortalidade em ambientes de saúde ressalta a vulnerabilidade das pessoas afetadas (Desai et al., 2012).

Quanto a estudos em países específicos, e começando pelo Brasil, um total de 90 amostras de fezes de indivíduos com sintomatologia característica de GEA, recolhidas entre 2005 e 2009, foram diagnosticadas positivamente para a presença de NoV. 71% corresponderam a vírus do GII, mas as restantes foram negativas para a presença de vírus dos GII e GI. 78% foram classificados como pertencentes ao GII.4, tendo sido também detetados títulos de estirpes dos genótipos 6, 12, 17, 7 e 16 do GII mas em considerável menor proporção. As variantes do GII.4 identificadas foram a “Hunter 2004”, a “Yerseke 2006” e a “Den Haag 2006b” (Fioretti *et al.*, 2011).

No que diz respeito a Singapura, as infeções gastrointestinais não são uma doença de notificação obrigatória, portanto a sua epidemiologia encontra-se pouco documentada. Entre 2004 e 2011, foram examinadas 1060 amostras de fezes positivas para a presença de NoV. As crianças de idades inferiores a 5 anos representaram 44,2% de todas as amostras de NoV positivas, 6 aos 64 anos 23% e mais do que 65 anos 27,6%. De 37 surtos documentados, constatou-se que a maioria ocorreu em enfermarias de hospitais, clínicas e lares de idosos. Etiologicamente, as estirpes do GII.4 foram responsáveis por 80,8% das epidemias registadas, 60% devidas à variante “Den Haag 2006b” e 24,6% à

“New Orleans 2009”, sendo que a primeira deixou de ser a prevalente após o aparecimento da segunda. As variantes dominantes durante 2004-2005, 2006-2009 e 2009-2011 foram, respetivamente, a “Hunter 2004”, a “Den Haag 2006b” e a “New Orleans 2009” (Lim *et al.*, 2013).

Na Austrália, entre 2009 e 2012, foram analisadas 1051 amostras de fezes recolhidas, de várias unidades públicas de saúde, de casos suspeitos de GEA. Após deteção dos agentes envolvidos, o genótipo mais identificado foi o 4 do GII, causador de 75% de todas as epidemias reportadas, com a variante “New Orleans 2009” predominante. No entanto, a partir de setembro de 2012, mas identificada pela primeira vez em março do mesmo ano, a variante “Sydney 2012” emergiu, sobrepondo-se à anteriormente dominante “New Orleans 2009”, considerada a então responsável por 27,7% e 51,8% das epidemias em 2012 na Austrália e na Nova Zelândia, respetivamente. Nesta observação, foram ainda detetadas as estirpes “Den Haag 2006b” (40 surtos entre 2009 e 2012), “Apeldoorn 2007” (27 surtos durante 2009 a 2011) e “Osaka 2007” (em 2011), esta última associada a um único surto. Na Nova Zelândia foi reconhecida uma nova variante do GII.4, designada na altura por “Auckland 2010”, agente etiológico de 3 surtos em 2010, considerada posteriormente como uma provável pré-versão da variante “Sydney 2012”. No total foram identificados 18 vírus não pertencentes ao GII.4: 7 do GI, 10 do GII e 1 do GIV, com o GII.6 a ser o genótipo não-GII.4 mais comumente identificado (51 surtos) (Eden *et al.*, 2014).

Na Dinamarca, num estudo de 3 meses de outubro a dezembro de 2012, após a primeira deteção da variante “Sydney 2012”, em novembro de 2012, observou-se de imediato um aumento exponencial de episódios de infeções gastrintestinais, mais tarde associados a esta nova estirpe do GII.4. Em 2011 realizaram-se 251 correspondências aos NoV em 1056 amostras de fezes dos doentes em estudo, enquanto que em 2012 de 670 amostras 213 foram positivas para a presença destes vírus. Da análise dos dados existentes antes da execução deste ensaio resultou a evidência de que a variante “New Orleans 2009” foi o vírus predominante de 2011 até abril de 2012, responsável por 45% dos surtos notificados. Nessa altura a “Sydney 2012” era identificada de forma esporádica até que a partir de outubro até dezembro de 2012 passou a ser associada a 43% das epidemias assinaladas. Contudo, a “New Orleans 2009” ainda era responsável por 34% das restantes epidemias registadas, tendo-se talvez considerado demasiado cedo que a

“Sydney 2012” poderia estar a substituir a estirpe até então prevalente (Fonager, Hindbæk, & Fischer, 2013).

Entre janeiro de 2008 e dezembro de 2012 foram colhidas 155 amostras de fezes numa pequena cidade da China, após 18 surtos de GEA etiológicamente não bacterianos, das quais 49,7% foram positivas para a presença de NoV. O genogruppo dominante (93%) foi o II, seguido pelas co-infecções de estirpes dos genogruppos I e II (18%) e do GI (8%). A variante “Den Haag 2006b” foi detetada até janeiro de 2011, somente predominante até 2009, já em co-circulação com a “New Orleans 2009”, prevalente de 2010 a 2011, e posteriormente a “Sydney 2012” foi a única identificada em 2012 (Ji *et al.*, 2013).

Em relação ao Canadá, especificamente em Alberta, foram analisadas as epidemias de infecções gastrointestinais comunicadas a agentes de saúde pública entre julho de 2008 e janeiro de 2013. Das amostras suspeitas de títulos de NoV, às quais foi possível realizar testes para o diagnóstico do agente etiológico, constatou-se que 68,4% foram positivas para a presença de NoV, 87,6% pertencentes ao GII, 11,1% ao GI e 1,3% a uma mistura de vírus dos GI e GII. Foi observado um aumento da atividade destes vírus depois de junho de 2012. O genótipo prevalente foi o 4 do GII (88,5%), seguido dos GII.12 e GII.1, e durante 3 anos a variante “Den Haag 2006b” do GII.4 foi considerada a estirpe dominante (de 2006 a 2009). Assumiu-se que a maior emergência destas infecções, de julho de 2008 a junho de 2009, estivesse relacionada com o fim da imunidade de curta duração, atribuída entre julho de 2006 e junho de 2007, juntamente a outros fatores, como a virulência desta variante, a circulação dos NoV no meio ambiente e em reservatórios humanos e exposição de populações sensíveis. Por outro lado, o aparecimento e predominância da variante “Auckland 2010” não corresponderam, como noutras variantes do GII.4, a um aumento do número de registos de episódios de GEA, entre julho de 2009 e junho de 2010. Observações similares foram registadas nos EUA, em período homólogo. A hipótese para esta observação passa pelo aparecimento do *Influenzavirus A* subtipo H1N1, que possivelmente limitou a investigação laboratorial etiológica de ocorrências de surtos de GEA. Também nesta altura foram reforçadas as medidas preventivas para o contágio destes vírus, como a lavagem das mãos e outras medidas de controlo da infeção, que consequentemente podem ter diminuído a transmissão dos NoV entre as populações de risco no período referido. Nos anos seguintes a suscetibilidade à inoculação dos NoV aumentou, eventualmente devido ao fim da imunidade de curta duração ou de imunidades incompletas. A mais nova variante

“Sydney 2012” do GII.4 surgiu entretanto como estirpe dominante. Nesta província, Alberta, a primeira identificação da “Sydney 2012” foi em setembro de 2011 e a segunda só em janeiro de 2012. No entanto, somente em outubro de 2012 se tornou a estirpe predominante, quase um ano depois da primeira detecção (Hasing *et al.*, 2013).

Vega e colegas (2014), através da consulta de sistemas informáticos dos EUA específicos para a notificação de epidemias de GEA associadas aos NoV, contabilizaram um total de 3960 surtos entre 2009 e 2013, dos quais 2254 (57%) ocorreram em estados localizados na costa norte-americana. Somente 2712 apresentavam o número de infectados, sendo esse valor entre os 3 e 1090 indivíduos por epidemia. 62,5% sucederam-se em instituições de cuidados a longo prazo, 9,8% em restaurantes, 5,7% em escolas, 5,4% em festas e afins, 3,6% em hospitais e 13% sem indicação do local de ocorrência do surto. A via de transmissão foi estabelecida em 2895 surtos: 83,7% resultantes do contacto pessoa-pessoa, 16,2% de origem alimentar e 0,1% atribuídos ao consumo de águas contaminadas. Verificou-se que o contágio através do contacto pessoa-pessoa foi o principal responsável pelas epidemias notificadas durante o outono/inverno, contrariamente às de origem alimentar, que ocorreram prevalentemente na primavera/verão. Os vírus dos genótipos do GI e do GII foram identificados em 435 (11%) e 3525 (89%) dos surtos, respetivamente. Dentro do GI, detetaram-se 3 genótipos predominantes pela seguinte ordem 6, 3 e 4. 2853 surtos (72%) apresentaram como agentes etiológicos os vírus do GII.4. Para além destes, identificaram-se estirpes dos genótipos 12, em 2009/2010, e 1, em 2011/2012, do GII. A variante “New Orleans 2009” do GII.4 provocou, em 2009, 1737 epidemias (44%), predominante nos 3 anos seguintes, com o maior número de episódios registados entre janeiro de 2010 e de 2012 e fevereiro de 2011. No que diz respeito à variante “Den Haag 2006b”, esta foi detetada em 4 épocas de inverno, ainda que em níveis mínimos e com uma diminuição gradual de 61, entre outubro de 2009 e março de 2010, para 6 epidemias, entre outubro de 2012 e abril de 2013. A variante “Sydney 2012” foi identificada pela primeira vez a setembro de 2012, tornando-se o vírus prevalente no inverno seguinte de 2012/2013, responsável por 896 (72,8%) dos 1098 surtos entre setembro de 2012 e abril de 2013, em comparação com 74 surtos (6,2%) associados à variante “New Orleans 2009”, ainda em circulação nesse ano. 84%, de um total de 2475 surtos ocorridos em locais de cuidados a longo prazo, tiveram como agente etiológico

uma das 3 variantes do GII.4 acima referidas ou a variante “Osaka 2007”, enquanto que os vírus do GI causaram apenas 6,4% dos surtos neste contexto. Concluiu-se que as estirpes do GII.4 eram mais propensas a envolver a via de transmissão pessoa-pessoa, ao contrário dos vírus dos genótipos 3, 6 e 7 do GI e 3, 6 e 12 do GII, constantemente associados a surtos de origem alimentar e locais de cuidados a longo prazo e hospitais (Vega *et al.*, 2014).

Ainda nos EUA, durante 2012, a deteção global de uma nova variante do GII.4, a “Sydney 2012”, levantou preocupações sobre o seu efeito potencial. Em 2012 e 2013 foram analisados os dados relativos a surtos de infeções gastrointestinais ocorridos em 6 estados, tendo estes sido posteriormente comparados a temporadas anteriores. Entre agosto de 2012 e abril de 2013 foram notificadas 637 epidemias causadas pelos NoV, em comparação com 536 e 432 em 2011-2012 e 2010-2011 no mesmo período. A proporção de surtos atribuídos a estes vírus aumentou de 8%, em setembro de 2012, para 82%, em março de 2013, interligados ao aparecimento dessa nova variante do GII.4. Em dezembro de 2012, a “Sydney 2012” tornou-se dominante, representando 66% de todos os surtos registados naquele mês. O modo de transmissão mais frequentemente implicado foi o contacto pessoa-pessoa (75,5%). Os episódios de GEA devidos a esta estirpe foram constantemente assinalados em serviços de saúde; os indivíduos mais afetados foram os de idades superiores a 50 anos; verificou-se diarreia ligeiramente mais regular nestes doentes, que nos indivíduos expostos a estirpes diferentes da “Sydney 2012”, e sintomas menos frequentes de vômito, febre e cólicas abdominais, diferindo de estudos anteriores. Contabilizaram-se 9 mortes (0,4%) derivadas da infeção por esta variante entre 2324 doentes, contra 3 mortes (0,2%) por vírus não-“Sydney 2012” em 1706 doentes (Leshem *et al.*, 2013).

Quanto a Portugal, não existe qualquer tipo de sistema de vigilância para notificação de surtos de infeções gastrointestinais, até porque esta não é uma doença de notificação obrigatória (Costa, Mesquita, Veiga, Oleastro, & Nascimento, 2014).

Foi realizada a interpretação dos dados existentes de toxinfecções especificamente devidas a alimentos, derivadas de 19 surtos entre 2009 e 2013, analisadas laboratorialmente pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Os NoV foram responsáveis somente por 5% de todas as epidemiais examinadas durante os 5

anos de estudo. Porém, em 2013, os vírus do genogrupo II dos NoV foram responsáveis por 2 dos 10 surtos diagnosticados por este laboratório (Viegas *et al.*, 2014).

Entre maio de 2011 e abril de 2013 objetivou-se definir quais os genogrupos e genótipos a circular em Portugal, principalmente determinar a presença da nova variante “Sydney 2012” do GII.4. Foram recolhidas as amostras de fezes de indivíduos internados em 13 hospitais de Portugal continental, com um quadro clínico característico de GEA. Das 580 amostras, 67 (11,6%) testaram positivo para a presença de NoV, dos quais 41 (61,2%) correspondiam a vírus pertencentes ao GII. Observou-se um claro predomínio das estirpes do genótipo 4 do GII (81,8%), com deteção de vírus dos GII.1, GII.3, GII.6 e GII.8 em iguais proporções (4,5%). Até maio de 2012, o vírus dominante foi a variante “New Orleans 2009” (81,8%); depois disso verificou-se uma alteração do vírus circulante, atribuída à variante “Sydney 2012” (100%) (Costa *et al.*, 2014).

A tabela 4 contém em resumo os pontos mais relevantes dos estudos anteriormente analisados.

Tabela 4: Estudos epidemiológicos e moleculares efetuados na área da infecção e doença gastrointestinal causadas pelos NoV, supracitados de forma exaustiva.

| Autores | País e época em estudo | Amostras/surtos em análise | Percentagem de detecção dos NoV | Genogrupos dominantes | Genótipos dominantes | Variantes do GII.4 em circulação |
|-------------------------------|--|-----------------------------------|--|--|--------------------------------|--|
| Matthews <i>et al.</i> (2012) | Vários países de todo o mundo, de dezembro de 1993 a março de 2010 | 754 | | GII (75%) GI (13%) GI + GII (12%) | GII.4 | |
| Desai <i>et al.</i> (2012) | 45 países, de janeiro de 1993 a junho de 2011 | | | | GII.4 (22%) Não-GII.4 (35%) | |
| Fioretti <i>et al.</i> (2011) | Brasil, de 2005 a 2009 | 90 | 100% | GII (71%) | GII.4 (78%) | “Hunter 2004” “Yerseke 2006” “Den Haag 2006b” |
| Lim <i>et al.</i> (2013) | Singapura, de 2004 a 2011 | 1060 | 100% | | GII.4 (80,8%) | “Hunter 2004” “Den Haag 2006b” “New Orleans 2009” |
| Eden <i>et al.</i> (2014) | Austrália, de 2009 a 2012 | 1051 | | | GII.4 (75%) | “New Orleans 2009” “Sydney 2012” “Den Haag 2006b” “Auckland 2010” “Apeldoorn 2007” “Osaka 2007” |
| Fonager <i>et al.</i> (2013) | Dinamarca, de outubro a dezembro de 2012 | 2011: 1056 2012: 670 | 2011: 23,8% 2012: 31,8% | | GII.4 | “New Orleans 2009” “Sydney 2012” |
| Ji <i>et al.</i> (2013) | China, de janeiro de 2008 a dezembro de 2012 | 155 | 49,7% | GII (93%) GI + GII (18%) GI (8%) | | “Den Haag 2006b” “New Orleans 2009” “Sydney 2012” |
| Hasing <i>et al.</i> (2013) | Canadá, de julho de 2008 a janeiro de 2013 | | 68,4% | GII (87,6%) GI (11,1%) GI + GII (1,3%) | GII.4 (88,5%) | “Den Haag 2006b” “Auckland 2010” “Sydney 2012” |
| Vega <i>et al.</i> (2014) | EUA, de 2009 a 2013 | 3960 | | GII (89%) GI (11%) | GII.4 (72%) | “New Orleans 2009” “Den Haag 2006b” “Sydney 2012” “Osaka 2007” |

| | | | | | | |
|-----------------------------|---|-----|---|-------------|---------------|-------------------------------------|
| Leshem <i>et al.</i> (2013) | EUA, de 2010 a 2013 | 637 | De 8% em setembro de 2012 para 82% em março de 2013 | | | “Sydney 2012” |
| Viegas <i>et al.</i> (2014) | Portugal, de 2009 a 2013 | 19 | 5% | GII (20%) | | |
| Costa <i>et al.</i> (2014) | Portugal, de maio de 2011 a abril de 2013 | 580 | 11,6% | GII (61,2%) | GII.4 (81,8%) | “New Orleans 2009” “Sydney 2012” |

E. Impacto económico e de recursos

Poucos estudos têm quantificado a saúde ou os custos sociais devidos a infeções gastrointestinais etiológicamente associadas aos NoV.

Uma única epidemia destes patogéneos num hospital dos EUA, com apenas 946 camas, implicou gastos de aproximadamente meio milhão de euros. De uma forma geral, estima-se que estes episódios causados pelos NoV representem despesas de 1,5 mil milhões de euros por ano (Lopman *et al.*, 2012).

Nos 2 anos de estudo de Payne *et al.* (2013), igualmente na América do norte, em crianças de idades inferiores a 5 anos infetadas pelos NoV, foram ultrapassadas as 14 mil hospitalizações, 281 mil atendimentos de urgência e 627 mil consultas de ambulatório, com custos inerentes superiores a 215 milhões de euros por ano.

No que concerne ao Reino Unido, representam custos de cerca de 1 milhão de euros por cada 1000 camas hospitalares e cerca de mil milhões por ano ao seu respetivo Serviço Nacional de Saúde (Lee *et al.*, 2011).

Num hospital suíço, um surto de GEA, com duração de 17 dias, afetou 16 indivíduos hospitalizados e 29 profissionais de saúde. A análise laboratorial das amostras de fezes colhidas de alguns destes doentes revelou que esta epidemia resultava da exposição aos NoV, além de que os testes realizados para a deteção de outras bactérias e vírus foram negativos. Em testes de diagnóstico houve um custo adicional de 2133€, relativamente ao aumento da ocupação de camas e encerramento de outras para prevenção da incidência de novos casos foi calculada uma perda de 29261€ e, portanto, um impacto financeiro total negativo de 31394€ em custos diretos. As despesas com a equipa de controlo da infeção, de 1109€, e com os cuidados de enfermagem, de 8117€, não foram contabilizadas pois não houve necessidade de contratação de mais funcionários (Zingg, Colombo, Jucker, Bossart, & Ruef, 2005).

As intervenções para controlo da infeção podem reduzir os custos finais inerentes ao desenvolvimento de surtos deste género. Por este motivo, Lee e seus colaboradores (2011) desenvolveram um modelo de simulação em computador para determinar o potencial de redução dos custos, tendo em atenção o número de infetados aquando da implementação das medidas interventivas e a eficácia das mesmas. Neste caso, foram testadas as seguintes condutas: (1) reforço das medidas de higiene de mãos,

com sabão, água e/ou álcool; (2) isolamento do contacto com os infetados pelos profissionais de saúde, através da utilização de vestuário de proteção (luvas, batas e máscaras); (3) reforço das práticas de desinfeção, pelo aperfeiçoamento da limpeza de enfermarias e casas de banho; (4) modificação das políticas de pessoal, para excluir o pessoal de trabalho infetado durante pelo menos 2 dias após fim da sintomatologia e proibir o pessoal exposto de trabalhar em áreas não afetadas; (5) separação dos doentes infetados, reunindo-os em quartos separados dos demais; e (6) encerramento da ala afetada sem novas admissões. Quanto ao aumento da higienização das mãos, logo após a deteção do primeiro caso, esta prática permite uma poupança entre os 1840€ (10% de eficácia) e os 16859€ (90% de eficácia). Contudo, a redução de custos aumenta com o número de casos primários, neste caso 5, e eficácia da intervenção: de 9034€ (10% de eficácia) até 82173€ (90% de eficácia). Relativamente ao ponto 2, um maior número de casos primários (5) e um aumento da eficácia das ações sugeridas (90%) proporciona uma diminuição nas despesas de 81365€. A desinfeção, desde que a eficiência da medida aplicada seja superior ou igual a 10% e imposta assim que é detetado o primeiro caso, proporciona igualmente uma redução de custos; com 5 casos primários a poupança fica entre os 8735€ (10% de eficácia) e os 78303€ (90% de eficácia). Sobre a quarta intervenção, a redução das despesas nas mesmas condições anteriores é de 1651€ a 30269€. O isolamento de doentes infetados e o encerramento da ala afetada representam uma atenuação de gastos somente quando a eficácia da prevenção de transmissão é muito alta (superior ou igual 90%), sendo que o seu valor económico diminui à medida que o número de camas por quarto e o número de camas vazias por ala aumentam. Em conclusão, o aumento da higiene das mãos, a utilização de vestuário de proteção e a desinfeção, impostas separadamente ou combinadas, representam as intervenções que permitem uma maior redução de despesas aos hospitais, no que diz respeito ao controlo e contenção de epidemias de GEA protagonizadas pelos NoV (Lee *et al.*, 2011).

E qual o valor económico que poderá vir a ter o desenvolvimento e implementação de uma vacina que promova a imunização contra os NoV? Bartsch e adjuntos (2012) debruçaram-se sobre esta questão investindo num modelo computadorizado que fornecesse essa resposta, tendo em conta parâmetros chave como a sua eficácia, custo, duração da proteção e idade de vacinação. Esta avaliação pode ajudar a orientar o seu desenvolvimento e implementação. A poupança em hospitalizações, com uma vacina com o preço de 20€, situa-se entre os 54 mil euros (75% eficaz e duração da proteção de

48 meses nas crianças com menos de 5 anos de idade) e os 620 mil euros (eficácia de 25% e duração da imunidade de 12 meses em crianças com idades compreendidas entre os 5 e os 14 anos). Caso a vacina apresente 75% de efetividade e um custo de 60€ a economia situa-se entre os 37 mil euros (duração de 48 meses dos 0 aos 4 anos de idade) e os 630 mil euros (duração de 12 meses dos 45 aos 64 anos). Quando se faz o balanço entre o custo da vacinação e a redução das despesas por prevenção dos efeitos de infeções devidas aos NoV, atendendo a uma vacinação eficaz em apenas 50% dos casos, com diferentes custos e duração de proteção, constata-se que para indivíduos de idades entre os 0 e os 4 anos a vacinação representa uma economia de gastos sempre que a vacina oferece proteção de 24 ou 48 meses. Na maioria dos outros grupos testados, cenários de custo e duração da imunidade a redução de custos variou entre os 0€ e o preço da vacina, sendo ainda sugeridas possíveis despesas adicionais para evitar outras doenças (Bartsch, Lopman, Hall, Parashar, & Lee, 2012).

Nos EUA, uma vacina 50% eficaz que conferisse imunidade por pelo menos 12 meses permitiria uma poupança de 1 a 2,2 milhões de euros, uma redução de 5,9 a 13%, mas resultaria em custos adicionais de 316 milhões a 800 mil milhões com 43 e 95% de cobertura da vacinação, respetivamente. A redução de despesas só seria possível se se optasse por uma vacina que garantisse proteção durante 48 meses, com um custo de 20€ e eficácia superior ou igual a 50% ou custo de 60€ e eficácia superior ou igual a 75%. As vacinas com essas características permitiriam uma economia de 80 milhões a 17 mil milhões de euros por ano (Bartsch et al., 2012).

Prevenção e terapêutica da infeção e doença

A. Controlo da infeção

Uma vez que atualmente não estão disponíveis quaisquer tratamento específico, vacina ou outras medidas preventivas da inoculação dos NoV as estratégias de controlo da infeção são fundamentais para evitar epidemias de grandes dimensões de episódios de GEA associados a estes vírus (Eden *et al.*, 2014; Koo *et al.*, 2010).

Estas práticas são fundamentais em instalações fechadas, principalmente em unidades de saúde e instalações de cuidados a longo prazo, onde a proximidade dos residentes pode facilitar uma rápida propagação dos mesmos (Koo *et al.*, 2010).

Os administradores de hospitais e especialistas em controlo da infeção indicam várias medidas de contenção durante estas epidemias: reforçar as medidas de higiene de mãos; isolar o contacto com os doentes, através da utilização do vestuário de proteção; isolar os indivíduos e os funcionários infetados; modificar a gestão dos funcionários, de modo a serem excluídos os que poderão estar infetados e proibir os mesmos de trabalhar em áreas não afetadas; modificar as políticas de visitas; reforçar as práticas de desinfeção, promovendo uma maior e melhor limpeza das enfermarias e casas de banho; educação dos profissionais de saúde, na identificação e eficácia das medidas de controlo; e vigilância ativa das epidemias (Lee *et al.*, 2011).

A medida considerada mais importante é a higienização das mãos, sendo relevante a escolha do método. Os desinfetantes à base de álcool, cada vez mais populares, aparentam eficácia limitada contra os NoV. Desta forma, a remoção mecânica pelas técnicas de lavagem de mãos, com água e sabão, parece ser mais eficaz que a utilização de álcool.

Quanto às superfícies, e atendendo à resistência dos NoV a vários agentes químicos de limpeza, estas devem ser limpas com hipoclorito de sódio a uma concentração mínima de 1000 partes por milhão, após limpeza com detergentes comuns (Arias *et al.*, 2013; Koo *et al.*, 2010).

Na precaução do contacto com os indivíduos doentes pelo uso de vestuário de proteção, do qual fazem parte a bata e as luvas, esta medida apenas é útil quando o contacto com estes é antecipado e quando há risco de contaminação com vômitos e fezes infetadas.

A separação dos casos suspeitos dos demais, pela utilização de diferentes quartos, é bastante incentivada.

Sobre os indivíduos que manifestarem sintomas de GEA, tanto profissionais de saúde como crianças e outros adultos, recomenda-se a ausência do local de trabalho por pelo menos 48 horas após resolução sintomática, porém não existem estudos formais de avaliação do período de tempo ideal em que estes podem retornar com segurança à escola ou ao trabalho para sustentar essas recomendações. Parece que as 48 horas não são suficientes em todos os casos, como os *food-handlers* e profissionais de saúde, capazes de expor um grande número de pessoas à doença; estudos demonstram excreção viral persistente até uma semana após resolução clínica (Koo *et al.*, 2010).

Relativamente a dados específicos sobre a importância destas medidas de controlo da infeção em unidades de saúde, no Reino Unido registaram-se na temporada 2007/2008 66 prováveis e 46 surtos confirmados na comunidade como sendo devidos aos NoV; em 2009/2010 este número aumentou para 116 e 81 surtos, respetivamente. Todavia, no hospital em estudo, com protocolo de controlo da infeção em vigor, foram detetadas 50 possíveis e 42 confirmadas em 2007/2008 e, após algumas modificações no protocolo em vigor na temporada anterior, 29 possíveis e 25 confirmadas epidemias causadas pelos NoV na temporada de 2009/2010, valores bastante menores que os registados na comunidade, tendo ainda sido verificada uma diminuição para praticamente metade dos surtos notificados entre a primeira e a segunda temporada na unidade hospitalar, ao contrário do que se sucedeu na comunidade. As principais alterações efetuadas entre um plano e outro, que permitiram tais resultados, foram: espaços de isolamento de doentes infetados mais fechados (com janelas e portas fechadas para separar adequadamente estes doentes dos demais) ao invés do encerramento das alas afetadas sem admissão de novos indivíduos; instalação de novos compartimentos para lavagem das mãos nestes novos espaços; funcionários divididos em 2 grupos, os que trabalhavam ou não nos compartimentos afetados, com equipamentos de proteção de cor diferente para serem facilmente identificados; restante pessoal, como o da cozinha e da lavandaria, impedidos de entrarem no espaço epidémico; limpeza 3 vezes ao dia, em vez de uma única vez, com um detergente de concentração 1:1000 partes por milhão (inferior à época anterior), dos quartos dos doentes e das casas de banho entre cada utilização; 9, em vez de 3, enfermeiros de controlo da infeção a visitar todos os dias os doentes e a avaliar os seus sintomas de vómitos/fezes (Illingworth *et al.*, 2011).

Na tabela 5 encontram-se os cuidados gerais a adotar para a prevenção de episódios de GEA, essencialmente em infantários/creches e escolas, casas de família e também lares de idosos.

Tabela 5: Precauções gerais a adotar em episódios de GEA (adaptado de Salgado, Castelo, & Dinis, 2009).

| Cuidados | Descrição das medidas a adotar |
|--|--|
| Gerais | Divisão de tarefas: indivíduos de preparação de alimentos diferentes dos indivíduos responsáveis pelas limpezas e desinfeção; |
| | Local de preparação de alimentos separado do local onde se colocam os “sujos”; |
| | Isolar os “sujos” dos residentes e/ou funcionários; |
| | Lavagem de mãos obrigatória após manuseio de alimentos, muda de fraldas, idas à casa de banho e contacto com animais ou suas excreções, independentemente do uso de luvas; |
| | Lavagem e desinfeção periódica de objetos partilhados entre adultos e crianças. |
| Na manipulação de fezes e vômitos | Utilização de luvas e/ou pinças para recolha de objetos, roupa, fraldas, entre outros; |
| | Lavagem das superfícies várias vezes ao dia, com detergentes, e posterior desinfeção, com hipoclorito de sódio preferencialmente; Separação de fraldas, roupas, panos, toalhas, luvas ou outros materiais dos restantes “sujos”. |
| Na utilização da água | Optar por águas municipais ou mineralizadas na preparação de alimentos, lavagem de utensílios e para consumo. |
| Na escolha e conservação de alimentos | Evitar alimentos mal conservados ou mal cozinhados. |
| Na preparação de alimentos | Adoção de medidas gerais de higiene; |
| | Indivíduos com feridas nas mãos não deverão manipular alimentos, exceto com luvas; |
| | Higienização frequente das mãos e/ou uso de luvas principalmente após manuseamento de carnes cruas, peixe, ovos ou outros alimentos; |
| | Caso se opte pela utilização de luvas estas deverão ser igualmente lavadas várias vezes ao dia, com os mesmos cuidados a ter na lavagem de mãos. |

B. Terapêutica

A escassez de modelos de culturas celulares e de animais constitui uma barreira significativa para o desenvolvimento de agentes antivirais. Sendo assim, a base do tratamento, por agora, consiste essencialmente em intervenções sintomáticas (Koo *et al.*, 2010).

Assim como para outras doenças diarreicas, a terapêutica inclui a reidratação oral com líquidos e eletrólitos, se o doente estiver alerta e capaz de beber, ou com fluidos intravenosos, se os vômitos e a desidratação forem significativos.

No que concerne a fármacos propriamente ditos, os redutores da motilidade e os agentes anti secretores podem ser particularmente úteis somente em adultos, para diminuir a frequência de excreção de fezes (Glass *et al.*, 2009; Koo *et al.*, 2010).

Na ausência de avanços significativos no desenvolvimento de uma vacina anti NoV, permanece o interesse no desenvolvimento de fármacos. Indivíduos com reduções graves e prolongadas na função imunológica são os candidatos mais fortes a obterem um maior benefício com a terapia medicamentosa contra estes microrganismos. O objetivo seria a redução da severidade da doença em geral pela interrupção da propagação destes vírus em áreas potencialmente epidémicas, como navios de cruzeiro, hospitais, bases militares e navais, unidades de cuidados crónicos, lares de idosos e outras instalações de cuidados a longo prazo, dormitórios escolares e todos os locais potencialmente sujeitos a *food-handlers*.

A compreensão das estratégias de replicação e patogénese no hospedeiro são fundamentais para o fabrico de medicamento antivirais. Os NoV, tal como outros vírus de RNA de cadeia positiva, apresentam no ciclo de replicação a sua entrada nas células do hospedeiro, seguida da replicação do genoma e maturação do vírus descendente e sua propagação para novas células. Qualquer uma destas etapas pode servir como alvo potencial para o desenvolvimento de inibidores da propagação destes vírus (Kaufman *et al.*, 2014).

De facto, numerosos alvos antivirais e inibidores de pequenas moléculas, com eficácia comprovada em culturas celulares e, pelo menos um, num modelo de ratinho de MNV, já foram identificados. Dentro destes têm-se as estratégias a nível da entrada do vírus, a inibição da produção de proteínas virais, da replicação viral e de fatores de segmentação envolvidos nos rearranjos celulares associados à infeção. Até ao momento, nenhum destes conseguiu aprovação para utilização clínica no tratamento ou prevenção das infeções gastrointestinais preconizadas pelos NoV. Neste caso, e tal como acontece com todas as terapias de direcionamento de agentes patogénicos intestinais, verifica-se um problema significativo associado à entrega do inibidor no sítio da replicação bem como

à estabilidade nesse ambiente. Portanto, há uma série de obstáculos que ainda têm de ser superados (Arias *et al.*, 2013).

Os fármacos Favipiravir, que deverão inibir o RdRp, ainda experimental, Ribavirina e constituídos por INF-alfa têm sido fortemente associados à redução da replicação viral dos HuNoV (Kaufman *et al.*, 2014).

A carga elevada e crescente da doença gastrointestinal, a alta prevalência destas infecções associadas aos NoV, principalmente entre as crianças, idosos e imunodebilitados, e as intervenções limitadas que são postas em prática para a prevenção das mesmas levaram alguns investigadores a avaliar a necessidade de métodos melhor tolerados e mais eficazes, como a vacinação (Glass *et al.*, 2009; Ramani *et al.*, 2014).

Os grupos alvo da vacinação podem incluir os 3 principais grupos de risco e outros já referidos, como os *food-handlers*, militares, viajantes, profissionais de saúde e educadores de infância. Além disso, os NoV são os principais agentes etiológicos de infecções universais entre as crianças, possivelmente a segunda causa mais comum de diarreia nos países em desenvolvimento, o que conduz à opinião de que as vacinas podem desempenhar um papel fundamental em programas que visam a redução da mortalidade infantil e controlo de doenças diarreicas (Glass *et al.*, 2009).

As VLP, partículas não replicantes desprovidas de genoma viral, e portanto que imitam a estrutura e propriedades antigénicas dos NoV nativos, foram designadas como as melhores estruturas para o desenvolvimento de vacinas, desde a sua descrição inicial há sensivelmente 20 anos (Atmar & Estes, 2012; Ramani *et al.*, 2014; Tamminen, Lappalainen, Huhti, Vesikari, & Blazevic, 2013). Estas são construídas a partir da proteína VP1, que se auto-organiza em VLP quando produzidas *in vitro* (Tamminen *et al.*, 2013).

Os estudos pré-clínicos demonstraram que as VLP são imunogénicas via parental, oral e intranasal, induzindo a produção de anticorpos no soro e nas mucosas, com respostas imunitárias na mucosa melhor alcançadas quando co-administradas com um adjuvante da mesma (Atmar & Estes, 2012; Ramani *et al.*, 2014).

Os modelos animais têm sido preferidos para o estudo da patogénese e proteção contra a infecção desencadeada pelos NoV. Todavia, cada um destes modelos apresenta limitações quando comparados com o modelo humano, tais como a excreção a curto

prazo e respostas imunitárias variáveis.

Os chimpanzés foram minuciosamente estudados para o desenvolvimento de vacinas contra outros vírus entéricos exigentes, como é o caso das Hepatites A e E, e, por esse motivo, pensa-se que este modelo animal poderá ser uma boa opção para os ensaios com os HuNoV.

Os chimpanzés Se⁺ foram então vacinados, via intravenosa, com 2 doses de VLP, do GI ou do GII, ou com um placebo, e sujeitos à inoculação do NV, estirpe GI.1, 2 e 18 meses após a administração da segunda dose da vacina. Os chimpanzés que receberam as VLP do GI ou do GII desenvolveram uma forte resposta de anticorpos séricos. Observou-se que os que foram imunizados com as VLP homólogas do GI apresentaram proteção contra a infecção derivada da inoculação do NV em ambos os momentos de sua administração, ou seja, não apresentaram qualquer vestígio deste vírus nas fezes; em contraste, os chimpanzés vacinados com as VLP do GII, genogrupo diferente do NV, ou placebo foram suscetíveis à infecção pelo NV. Porém, entre o grupo que recebeu as VLP do GI e o outro que recebeu as VLP do GII não foram reportadas quaisquer diferenças em relação à duração e carga viral do NV excretado nas fezes.

O ensaio de bloqueio da ligação deste grupo de vírus aos HBGA tem sido utilizado como um substituto da neutralização mediada pelos anticorpos contra os NoV. Para testar a correlação deste ensaio com o anterior foram obtidas amostras de soro dos chimpanzés em estudo no período pré e pós-vacinação (60 dias após imunização) e avaliadas para o bloqueio da ligação das VLP aos HBGA. No caso dos chimpanzés vacinados com as VLP do GII ou com o placebo, que eram suscetíveis à infecção após o desafio com o NV, não foi exibido qualquer bloqueio da ligação destas VLP aos HBGA. No entanto, o grupo que se apresentou resistente à infecção pelo vírus inoculado, portanto imunizado com as VLP do GI, desenvolveu anticorpos que bloqueavam a ligação das VLP administradas aos HBGA (Bok *et al.*, 2011).

Os estudos iniciais de fase I avaliaram a segurança e imunogenicidade da imunização com doses crescentes de VLP do NV.

Na sequência dos mesmos avaliou-se a administração intranasal de VLP do NV em adultos saudáveis e Se⁺, a quem foram administradas 2 doses desta vacina e, após 3 semanas de intervalo, sujeitos à inoculação de NV, numa dose aproximadamente 10

vezes superior à requerida para infetar 50% dos participantes. Como resultado, obteve-se que indivíduos vacinados com as VLP do NV eram menos propensos a desenvolver GEA (37 *versus* 69%) e menos suscetíveis à infecção pelo NV (61 *versus* 82%) comparativamente aos que receberam o placebo. Entre os indivíduos vacinados que desenvolveram na mesma GEA foram observados atrasos no início da doença e redução global da sua gravidade (Ramani *et al.*, 2014).

Num outro ensaio sobre esta temática, indivíduos entre os 18 e os 50 anos e Se⁺ foram sujeitos, após divisão em 2 grupos, numa primeira fase, à vacinação com VLP ou com um placebo, em 2 doses com 3 semanas de intervalo, via intranasal, e, na outra fase, à inoculação do NV. A vacina em estudo era composta por 100 microgramas de VLP do NV, produzidas num sistema de expressão do Baculovírus; pelo monofosforil lípido A, como adjuvante; pelo chitosan, como agente muco-adesivo; e pelos excipientes sacarose e manitol, agentes de volume utilizados com o objetivo de estabilizar as VLP durante a sua liofilização. Os efeitos adversos locais (nasais) e sistémicos foram mais frequentes no “grupo vacina” do que no “grupo controlo” e no dia da imunização. No final de todo o procedimento, 38 pessoas faziam parte do “grupo vacina” e 39 do “grupo placebo”, ambos sujeitos à inoculação do NV. Os voluntários, após administração do vírus, foram acompanhados durante pelo menos 4 dias para ser possível a deteção de possíveis manifestações clínicas de infecção gastrointestinal, tendo sido recolhidas amostras de fezes para testar a sua presença. As amostras de soro foram colhidas antes da primeira administração e 3 semanas depois de ter sido concedida a segunda dose. Nos ensaios serológicos constatou-se um aumento bastante significativo dos valores de anticorpos séricos (IgA, IgG e IgM) em 70% dos indivíduos que foram imunizados com as VLP do NV. A GEA, associada à inoculação do NV, foi registada em 69% dos voluntários que receberam o placebo e 37% dos que foram imunizados. Esta vacina também reduziu a frequência de infecção após inoculação do vírus: 82% dos que receberam placebo contra 1% dos que receberam a vacina. O início e gravidade da doença foram significativamente menores no “grupo vacina” quando comparado com o “grupo placebo” (Atmar *et al.*, 2011).

Estes estudos são importantes para demonstrar que uma vacina contra os NoV com as VLP pode induzir imunidade protetora. Contudo, tem-se dado destaque ao genótipo 1 do GI (o NV) mas os vírus mais frequentemente envolvidos na doença e infecção são os do genótipo 4 do GII.

Os estudos que utilizaram vírus dos genogrupos I ou II, realizados na década de 1970, em chimpanzés não conseguiram demonstrar proteção heterotípica, sugerindo que uma vacina eficaz pode precisar de incluir VLP de ambos. Para solucionar esta questão novas VLP do GII.4 têm vindo a ser desenvolvidas.

Estudos pré-clínicos com estas novas VLP, designadas por VLP de consenso, mostram que a imunização intramuscular de uma formulação bivalente, incluindo o GI.1 e as VLP de consenso, tem a capacidade de induzir níveis de anticorpos mais elevados do que a intranasal. Os primeiros ensaios sobre a imunização através da via intramuscular com estas novas vacinas em voluntários adultos estão completos, não tendo havido notificação de quaisquer eventos adversos graves. A vacina mostrou ser imunogénica, com respostas de IgA e IgG para ambas as VLP observadas 7 dias após administração da primeira dose. Aquando da segunda dose não se verificou qualquer aumento significativo na resposta de anticorpos. A imunogenicidade de uma dose única desta formulação bivalente, avaliada em adultos de diferentes faixas etárias (dos 18 aos 49, dos 50 aos 64 e dos 65 aos 85 anos), apresentou menor variação da resposta imunitária nos indivíduos mais velhos (65 aos 85 anos) (Ramani *et al.*, 2014).

Estes resultados de ensaios clínicos e pré-clínicos demonstraram que é possível prevenir a doença e infeção associadas aos NoV através da vacinação. Foi demonstrada proteção homotípica quando as VLP e o vírus inoculado são do mesmo genogrupo. Uma vacina amplamente eficaz terá de ser provavelmente constituída por um mínimo de vírus que representem os 2 principais genogrupos que infetam seres humanos (GI e GII). Além disso, admite-se que o envelhecimento e a presença de doenças crónicas poderão influenciar negativamente a respostas imunitária (Atmar & Estes, 2012).

Estas vacinas compostas por VLP têm sido exaustivamente investigadas, com bons resultados nas fases I e II de ensaios clínicos, como anteriormente referido.

Porém, as partículas P, um outro tipo de partículas subvirais destes vírus, têm sido estudadas como uma alternativa às VLP ou constituintes de uma vacina de segunda geração, assumindo a imunização através de VLP a primeira opção (Tan & Jiang, 2012). Estas partículas revelaram ser extremamente imunogénicas, muito estáveis e eficientemente produzidas, através de várias modificações artificiais para um maior rendimento e estabilidade das mesmas, nos sistemas de expressão da *Escherichia coli* e *Pichia pastoris* (Tan & Jiang, 2012; Tan *et al.*, 2011).

A tentativa de imunização de ratinhos com 15 a 50 microgramas de partículas P 3 a 4 vezes por dia por ratinho, via intranasal sem adjuvante ou via subcutânea com adjuvante, culminou em níveis elevados de anticorpos contra as VLP dos NoV. Na verdade, verificou-se o bloqueio da interação entre estas VLP e os recetores HBGA, impedindo a infecção e doença desencadeadas por estes vírus (Tan & Jiang, 2012).

Uma característica adicional, com importância clínica, destas partículas P é a presença de 3 *loops* superficiais, que permitem a agregação de antígenos não-NoV. Desta forma, as partículas P podem ser utilizadas como constituintes de vacinas anti NoV e, ao mesmo tempo, como base para o desenvolvimento de vacinas combinadas, para imunização de outros agentes patogénicos virais e bacterianos além dos NoV (Tan & Jiang, 2012; Tan *et al.*, 2011).

Uma outra área promissora é a imunoprofilaxia ou imunoterapia passiva com mAb dos NoV. Atendendo a que as Ig dos chimpanzés são praticamente idênticas às humanas, e que os mAb humanos administrados a chimpanzés apresentam uma meia-vida comparável à meia-vida de IgG humanas em seres humanos, os mAb derivados de chimpanzés podem ser administrados a seres humanos sem modificações. E neste estudo foi exatamente esse o procedimento, em que se constatou que os mAb possuem a capacidade de inibir a hemaglutinação dos NV e a sua ligação aos HBGA. Verificou-se ainda a sua eficácia na prevenção da infecção causada pela exposição ao NV, uma vez que as análises efetuadas às amostras de fezes recolhidas após inoculação com este vírus testaram negativo para a presença do mesmo (Chen *et al.*, 2013).

Os obstáculos para o desenvolvimento de uma vacina contra os NoV são multifatoriais: utilizam um reservatório humano, requerem uma dose infecciosa muito baixa, são estáveis no ambiente, carecem de imunidade a longo prazo, evoluem rapidamente, culminando no aparecimento de novas variantes, e têm várias vias de transmissão. Todos estes fatores considerados importantes contribuintes para a persistência destes vírus na população (Herbst-kralovetz *et al.*, 2010).

Desta forma, várias dúvidas persistem...

Qual a duração da proteção após exposição aos NoV e à sua vacinação? (Ramani *et al.*, 2014). A frequência e a grandeza da resposta de anticorpos presentes no soro após imunização foram menores que as produzidas pela infecção. A imunidade natural (em

média inferior a 2 anos) é de curta duração, apesar de um recente estudo modelo sugerir imunidade após infecção de 4 a 9 anos; a duração da proteção após a vacina ainda não foi determinada com precisão (Atmar *et al.*, 2011; Ramani *et al.*, 2014).

A maior taxa de mortalidade é entre os idosos imunodeprimidos. A vacina neste grupo de alto risco será eficaz?

E serão essas vacinas eficazes em populações pediátricas, entre as quais os NoV têm um peso significativo? Para essa população existem em curso alguns estudos sobre o desenvolvimento de vacinas combinadas contra os RV e NoV. (Ramani *et al.*, 2014).

Tan e Jiang (2012) referem a produção de uma vacina bivalente anti NoV e anti RV, constituída por partículas P quiméricas, com um dos principais antigénios de neutralização (VP8) dos RV no *loop* número 2 destas partículas. Após imunização dos ratinhos observou-se uma resposta significativamente mais elevada de anticorpos anti VP8 e ainda proteção heterotípica com esta combinação, em comparação com a administração do VP8 isoladamente. Por último, constataram-se elevados títulos de anticorpos específicos contra os NoV, capazes de bloquear a ligação das VLP aos recetores HBGA, associada à proteção contra a infeção e doença associadas a estes vírus (Tan & Jiang, 2012).

Depois, como irá afetar a evolução dos NoV a eficácia da vacina contra os vírus emergentes? (Herbst-kralovetz *et al.*, 2010; Koo *et al.*, 2010). A constante derivação antigénica e alterações moleculares dos NoV, que resultam no aparecimento de novas variantes, também podem limitar a proteção generalizada destas vacinas, e assim o seu sucesso pode depender da vigilância dos genótipos circulantes para os quais estas vacinas terão de ser desenvolvidas (Koo *et al.*, 2010; Ramani *et al.*, 2014). Sabe-se ainda que a proteção cruzada é limitada aos genótipos de NoV dentro do mesmo genogrupo, pois não existe qualquer evidência de proteção cruzada entre genogrupos, dada a elevada heterogeneidade genética destes vírus. Como tal as vacinas polivalentes serão a melhor opção para proteger os indivíduos suscetíveis (Herbst-kralovetz *et al.*, 2010; Koo *et al.*, 2010).

Em resposta às duas últimas questões, Tamminen e colaboradores (2013) produziram uma vacina injetável trivalente, para a prevenção da infeção e doença induzidas pelos vírus entéricos RV e NoV, administrada a ratinhos. Esta vacina era composta por uma

combinação de VLP do GI.3, uma vez que, de acordo com os autores, este genótipo do GI tem sido predominante no que diz respeito à infecção pelos NoV em crianças da Finlândia, e do GII.4 e da proteína recombinante VP6 dos RV, a mais estável e abundante proteína dos RV. Após a sua administração, foram registados altos níveis séricos de IgG específicas contra os NoV e RV. Curiosamente desenvolveram-se anticorpos IgG de reação cruzada contra os NoV heterólogos de VLP não administradas, nomeadamente para a variante “New Orleans 2009” do GII.4, GII.12 e GI.1, e para diferentes RV de culturas celulares. Os anticorpos específicos para os NoV exibiram a capacidade de bloquear a ligação das VLP homólogas e heterólogas aos recetores putativos e aos HBGA, com consequente diminuição da infecção. Esta redução foi igualmente observada no caso dos RV. Além disso, foram detetadas células T de reação cruzada responsáveis pela resposta imune contra os NoV e antígenos específicos contra os RV, respostas estas com duração de 6 meses. Estes investigadores comprovaram ainda que a combinação de VLP do GI e GII permite obter respostas imunes de reação cruzada e potencial de neutralização mais elevados do que qualquer uma das VLP destes 2 genogrupos administradas individualmente (Tamminen *et al.*, 2013).

Todos os fatores supracitados são essenciais para o desenvolvimento de vacinas anti NoV. Porém, são fundamentais mais estudos em campo onde existam vários genótipos em circulação, para validar a sua eficácia (Ramani *et al.*, 2014).

Conclusão

Os avanços recentes na detecção e diagnóstico dos NoV, e os estudos epidemiológicos e moleculares entretanto efetuados, comprovaram que estes microrganismos sobrepõem-se atualmente aos RV, no que diz respeito aos principais agentes etiológicos de episódios de GEA. Esta tendência tende a ser cada vez mais evidente, essencialmente devido ao desenvolvimento e comercialização da vacina anti RV e, somente em alguns países desenvolvidos, à sua integração em programas de imunização obrigatória.

Analogamente o pico destas ocorrências coincide curiosamente com os meses de inverno mais chuvosos, e não com os mais frios como outrora suposto.

Na comunidade, a população pediátrica, geriátrica e imunodeprimida parecem ser, pela deficiente imunidade, doenças concomitantes ou outros fatores subjacentes, as mais suscetíveis à inoculação e subseqüentes infeção e complicações associadas aos NoV.

Os vírus do GII.4 apresentam-se como predominantes, existindo uma relação diretamente proporcional entre o aparecimento de novas variantes destes vírus, a cada 2-4 anos, e um aumento do número de casos reportados de infeções gastrointestinais.

Apesar dos recentes e promissores avanços na terapêutica da infeção derivada dos NoV, principalmente através do desenvolvimento de uma vacina anti NoV ou bivalente anti NoV e anti RV, os planos de controlo da infeção, essencialmente pela implementação de medidas de higiene de mãos e desinfeção eficientes, continuam a reunir as intervenções mais importantes para precaver epidemiais e, porventura, pandemias relacionadas com a exposição a estes vírus.

Além do mais, a prática da grande maioria das medidas sugeridas e introdução da vacina contra os NoV, em determinadas condições, como imunização obrigatória, por enquanto de acordo com modelos computacionais, resultará numa redução dos custos inerentes a estes tipos de surtos.

Uma vez que se encontra comprovado o papel fulcral que os NoV representam na comunidade são necessários mais estudos de campo para entender a necessidade da investigação, desenvolvimento e implementação da imunização ou de outras terapêuticas contra estes microrganismos e se estas serão eficazes, atendendo, além de outras condicionantes, à sua grande variabilidade genética e curta imunidade concedida.

Bibliografia

- Ahmed, S. M., Lopman, B. A., & Levy, K. (2013). A systematic review and meta-analysis of the global seasonality of Norovirus. *PLOS ONE*, 8(10), 1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0075922.
- Anstee, D. J. (2010). The relationship between blood groups and disease. *Blood*, 115(115), 4635–4643. doi: 10.1182/blood-2010-01-261859.
- Arias, A., Emmott, E., Vashist, S., & Goodfellow, I. (2013). Progress towards the prevention and treatment of Norovirus infections. *Future Microbiology*, 8(11), 1475–1487. doi: 10.2217/fmb.13.109.
- Arvelo, W. Sosa, S. M., Juliao, P., López, M. R., Estévez, A., López, B., ... Lindblade, K. A. (2012). Norovirus outbreak of probable waterborne transmission with high attack rate in a Guatemalan resort. *Journal of Clinical Virology*, 55, 8–11. doi: 10.1016/j.jcv.2012.02.018.
- Atmar, R. L., Bernstein, D. I., Harro, C. D., Al-Ibrahim, M. S., Wilbur, H. C., Ferreira, J., ... Mendelman, P. M. (2011). Norovirus vaccine against experimental human Norwalk virus illness. *New England Journal of Medicine*, 365(23), 2178–2187. doi: 10.1056/NEJMoA1101245.
- Atmar, R. L., & Estes, M. K. (2001). Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(1), 15–37. doi: 10.1128/CMR.14.1.15.
- Atmar, R. L., & Estes, M. K. (2012). Norovirus vaccine development - next steps. *Expert Review Vaccines*, 11(9), 1023–1025. doi: 10.1586/erv.12.78.
- Bank-Wolf, B. R., König, M., & Thiel, H. J. (2010). Zoonotic aspects of infections with noroviruses and sapoviruses. *Veterinary Microbiology*, 140, 204–212. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.08.021.
- Barret, A. S., Jourdan-da Silva, N., Ambert-Balay, K., Delmas, G., Bone, A., Thiolet, J. M., & Vaillant, V. (2014). Surveillance for outbreaks of gastroenteritis in elderly long-term care facilities in France, November 2010 to May 2012. *Euro*

Surveillance, 19(29), 1–8.

Bartsch, S. M., Lopman, B. A., Hall, A. J., Parashar, D., & Lee, B. Y. (2012). The potential economic value of a human Norovirus vaccine for the United States. *Vaccine*, 30(49), 7097–7104. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.09.040.

Bertolotti-ciarlet, A., Crawford, S. E., Hutson, A. M., & Estes, M. K. (2003). The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *Journal of Virology*, 77(21), 11603–11615. doi: 10.1128/JVI.77.21.11603.

Bertolotti-Ciarlet, A., White, L. J., Chen, R., Prasad, B. V., & Estes, M. K. (2002). Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *Journal of Virology*, 76(8), 4044–4055. doi: 10.1128/JVI.76.8.4044.

Bok, K., Parra, G. I., Mitra, T., Abente, E., Shaver, C. K., Boon, D., ... Green, K. Y. (2011). Chimpanzees as an animal model for human Norovirus infection and vaccine development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(1), 325–330. doi: 10.1073/pnas.1014577107.

Bucardo, F., Reyes, Y., Svensson, L., & Nordgren, J. (2014). Predominance of Norovirus and Sapovirus in Nicaragua after implementation of universal Rotavirus vaccination. *PLOS ONE*, 9(5), 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0098201.

Bull, R. A., & White, P. A. (2011). Mechanisms of GII.4 Norovirus evolution. *Trends in Microbiology*, 19(5), 233–240. doi: 10.1016/j.tim.2011.01.002.

Cancelinha, C., Salminen, M., Marlow, R., Silva, P., Marinho, J., Puustinen, L., ... Rodrigues, F. (2013). Gastreenterite aguda por Rotavírus e Norovírus num serviço de urgência pediátrica. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 44(4), 143–147. doi: 0873-9781/13/44-4/143.

Cangemi, J. R. (2011). Food poisoning and diarrhea: small intestine effects. *Current Gastroenterology Reports*, 13, 442–448. doi: 10.1007/s11894-011-0209-5.

- CDC. (2011). Updated Norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 60(3), 1–20.
- Chaimongkol, N., Khamrin, P., Malasao, R., Thongprachum, A., Kongsricharoern, T., Ukarapol, N., ... Maneekarn, N. (2014). Molecular characterization of Norovirus variants and genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in Thailand. *Journal of Medical Virology*, 86, 1210–1218. doi: 10.1002/jmv.23781.
- Chen, S., & Chiu, C. (2012). Worldwide molecular epidemiology of Norovirus infection. *Paediatrics and International Child Health*, 32(3), 128–131. doi: 10.1179/2046905512Y.0000000031.
- Chen, Z., Sosnovtsev, S. V, Bok, K., Parra, G. I., Makiya, M., Agulto, L., ... Purcell, R. H. (2013). Development of Norwalk virus-specific monoclonal antibodies with therapeutic potential for the treatment of Norwalk virus gastroenteritis. *Journal of Virology*, 87(17), 9547–9557. doi: 10.1128/JVI.01376-13.
- Cilli, A., Luchs, A., Morillo, S. G., Costa, F. F., Carmona, R. D., & Timenetsky, M. C. (2011). Characterization of Rotavirus and Norovirus strains: a 6-year study (2004–2009). *Jornal de Pediatria*, 87(5), 445–449. doi: 10.2223/JPED.2122.
- Costa, I., Correia, C., Brito, M. J., Correia, P., Ferreira, G. C., Simões, M. J., & Oleastro, M. (2011, setembro). *Detection of a viral agents in acute gastroenteritis in hospitalized children from Lisbon area*. Comunicação apresentada no 14º Encontro Anual da Sociedade europeia de Virologia clínica, Madeira.
- Costa, I., Júlio, C., Rodrigues, J., Simões, M. J., Machado, J., Sarioglou, K., ... Oleastro, M. (2013). Estudo da etiologia das infeções gastrintestinais agudas em crianças hospitalizadas na área de Lisboa. *Boletim Epidemiológico - Observações*, 3(6), 11–12.
- Costa, I., Mesquita, J., Veiga, E., Oleastro, M., & Nascimento, M. S. (2014). Novo genótipo de Norovírus em doentes com gastrenterite aguda, 2011-2013. *Boletim*

Epidemiológico - Observações, 3(11), 41–43.

Desai, R., Hembree, C. D., Handel, A., Matthews, J. E., Dickey, B. W., McDonald, S., ... Lopman, B. (2012). Severe outcomes are associated with genogroup 2 genotype 4 Norovirus outbreaks: a systematic literature review. *Clinical Infectious Diseases*, 55(2), 189–193. doi: 10.1093/cid/cis372.

Di Bartolo, I., Monini, M., Losio, M. N., Pavoni, E., Lavazza, A., & Ruggeri, F. M. (2011). Molecular characterization of noroviruses and rotaviruses involved in a large outbreak of gastroenteritis in Northern Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15), 5545–5548. doi: 10.1128/AEM.00278-11.

Donaldson, E. F., Lindesmith, L. C., Lobue, A. D., & Baric, R. S. (2010). Viral shape-shifting: Norovirus evasion of the human immune system. *Nature Reviews. Microbiology*, 8, 231–241. doi: 10.1038/nrmicro2296.

Eden, J., Hewitt, J., Lee, K., Boni, M. F., & Merif, J. (2014). The emergence and evolution of the novel epidemic Norovirus GII.4 variant Sydney 2012. *Virology*, 0, 106–113. doi: 10.1016/j.virol.2013.12.005.

EMA. (2011). Rotarix - EPAR summary for the public. Disponível em http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR__Summary_for_the_public/human/000639/WC500054587.pdf.

EMA. (2012). RotaTeq - EPAR summary for the public. Disponível em http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR__Summary_for_the_public/human/000669/WC500054181.pdf.

Escobar, C. G., Silva, T., Costa, B., Oliveira, M., Correia, P., Ferreira, G. C., ... Fernando, D. (2013). Gastroenterite aguda em crianças internadas na área de Lisboa. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 44(4), 155–162. doi: 0873-9781/13/44-4/155.

Estes, M. K., Ball, J. M., Guerrero, R. A., Opekun, A. R., Gilger, M. A., Pacheco, S. S., & Graham, D. Y. (2000). Norwalk virus vaccines: challenges and progress. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(2), 367–373. doi: 10.1086/315579.

- Estévez, A., Arvelo, W., Hall, A. J., Lopes, M., Lopes, B., Reyes, L., ... Lindblade, K. A. (2013). Prevalence and genetic diversity of Norovirus among patients with acute diarrhea in Guatemala. *Journal of Medical Virology*, 85, 1293–1298. doi: 10.1002/jmv.23578.
- Fankem, S. L., Boone, S. A., Gaither, M., & Gerba, C. P. (2014). Outbreak of Norovirus illness in a college summer camp: impact of cleaning on occurrence of Norovirus on fomites. *Journal of Environmental Health*, 76(8), 20–26.
- Fioretti, J. M., Ferreira, M. S., Victoria, M., Vieira, C. B., Xavier, M. D., Leite, J. P., & Miagostovich, M. P. (2011). Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(8), 942–947. doi: 10.1590/S0074-02762011000800008.
- Flores, J., & Okhuysen, P. C. (2009). Genetics of susceptibility to infection with enteric pathogens. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 22(5), 471–476. doi: 10.1097/QCO.0b013e3283304eb6.
- Fonager, J., Hindbæk, L. S., & Fischer, T. K. (2013). Rapid emergence and antigenic diversification of the Norovirus 2012 Sydney variant in Denmark, October to December, 2012. *Euro Surveillance*, 18(9), 10–13.
- Franck, K. T., Fonager, J., Ersbøll, A. K., & Böttiger, B. (2014). Norovirus epidemiology in community and health care settings and association with patient age, Denmark. *Emerging Infectious Diseases*, 20(7), 1123–1131. doi: 10.3201/eid2007.130781.
- Frangé, P., Touzot, F., Debré, M., Héritier, S., Leruez-Ville, M., Cros, G., ... Avettand-Fenoël, V. (2012). Prevalence and clinical impact of Norovirus fecal shedding in children with inherited immune deficiencies. *The Journal of Infectious Diseases*, 206, 1269–1274. doi: 10.1093/infdis/jis498.
- Glass, P. J., White, L. J., Ball, J. M., Leparç-Goffart, I., Hardy, M. E., & Estes, M. K. (2000). Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *Journal of Virology*, 74(14), 6581–6591.

- Glass, R. I., Parashar, U. D., & Estes, M. K. (2009). Norovirus gastroenteritis. *The New England Journal of Medicine*, 361(18), 1–17. doi: 10.1056/NEJMra0804575.
- Green, K. Y. (2014). Norovirus infection in immunocompromised hosts. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 717–723. doi: 10.1111/1469-0691.12761.
- Green, K. Y., Ando, T., Balayan, M. S., Berke, T., Clarke, I. N., Estes, M. K., ... Thiel, H. J. (2000). Taxonomy of the caliciviruses. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(2), 322–330. doi: 10.1086/315591.
- Greenberg, H. B., Valdesuso, J. R., Kalica, A. R., Wyatt, R. G., McAuliffe, V. J., Kapikian, A. Z., & Chanock, R. M. (1981). Proteins of Norwalk virus. *Journal of Virology*, 37(3), 994–999. doi: 0022-538X/81/030994-06\$02.00/0.
- Hall, A. J. (2012). Noroviruses: the perfect human pathogens? *The Journal of Infectious Diseases*, 205, 1622–1624. doi: 10.1093/infdis/jis251.
- Hall, A. J., Lopman, B. A., Payne, D. C., Patel, M. M., Gastañaduy, P. A., Vinjé, J., & Parashar, U. D. (2013). Norovirus disease in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 19(8), 1198–1205. doi: 10.3201/eid1908.130465.
- Hall, A. J., Wikswo, M. E., Pringle, K., Gould, H., & Parashar, U. D. (2014). Vital signs: Foodborne Norovirus outbreaks - Unites States, 2009-2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 63(22), 491–495.
- Hardy, M. E. (2005). Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiology Letters*, 253, 1–8. doi: 10.1016/j.femsle.2005.08.031.
- Harris, J. P., Edmunds, W. J., Pebody, R., Brown, D. W., & Lopman, B. A. (2008). Deaths from Norovirus among the Elderly, England and Wales. *Emerging Infectious Diseases*, 14(10), 1546–1552. doi: 10.3201/eid1410.080188.
- Hasing, M. E., Lee, B. E., Preiksaitis, J. K., Tellier, R., Honish, L., Senthilselvan, A., & Pang, X. L. (2013). Emergence of a new Norovirus GII.4 variant and changes in the historical biennial pattern of Norovirus outbreak activity in Alberta, Canada, from 2008 to 2013. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(7), 2204–2211. doi: 10.1128/JCM.00663-13.

- Hemming, M., Räsänen, S., Huhti, L., Paloniemi, M., Salminen, M., & Vesikari, T. (2013). Major reduction of Rotavirus, but not Norovirus, gastroenteritis in children seen in hospital after the introduction of RotaTeq vaccine into the National Immunization Programme in Finland. *European Journal of Pediatrics*, 172, 739–746. doi: 10.1007/s00431-013-1945-3.
- Herbst-kralovetz, M., Mason, H. S., & Chen, Q. (2010). Norwalk virus-like particles as vaccines. *Expert Review Vaccines*, 9(3), 299–307. doi: 10.1586/erv.09.163.
- Hoa Tran, T. N., Trainor, E., Nakagomi, T., Cunliffe, N. A., & Nakagomi, O. (2013). Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *Journal of Clinical Virology*, 56, 185–193. doi: 10.1016/j.jcv.2012.11.011.
- Hodges, K., & Gill, R. (2010). Infectious diarrhea - cellular and molecular mechanisms. *Gut Microbes*, 1(1), 4–21.
- Huang, P., Farkas, T., Zhong, W., Tan, M., Thornton, S., Morrow, A. L., & Jiang, X. (2005). Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. *Journal of Virology*, 79(11), 6714–6722. doi: 10.1128/JVI.79.11.6714.
- ICTV. (2013). Virus Taxonomy. Acedido a 3 de agosto de 2014, disponível em <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
- Illingworth, E., Taborn, E., Fielding, D., Cheesbrough, J., Diggle, P. J., & Orr, D. (2011). Is closure of entire wards necessary to control Norovirus outbreaks in hospital? Comparing the effectiveness of two infection control strategies. *Journal of Hospital Infection*, 79, 32–37. doi: 10.1016/j.jhin.2011.04.024.
- Ji, L., Wu, X., Yao, W., Chen, L., Xu, D., Shen, Y., ... Han, J. (2013). Rapid emergence of novel GII.4 sub-lineages noroviruses associated with outbreaks in Huzhou, China, 2008-2012. *PLOS ONE*, 8(12), 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0082627.

- Jiang, X., Matson, D. O., Ruiz-Palacios, G. M., Hu, J., Treanor, J., & Pickering, L. K. (1995). Expression, self-assembly, and antigenicity of a snow mountain agent-like Calicivirus capsid protein. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(6), 1452–1455.
- Jin, M., He, Y., Li, H., Huang, P., Zhong, W., Yang, H., ... Duan, Z. (2013). Two gastroenteritis outbreaks caused by GII noroviruses: host susceptibility and HBGA phenotypes. *PLOS ONE*, 8(3), 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0058605.
- Kapikian, A. Z. (2000). The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(2), 295–302. doi: 10.1086/315584.
- Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica, A. R., & Chanock, R. M. (1972). Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Virology*, 10(5), 1075–1081.
- Karst, S. M. (2010). Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. *Viruses*, 2, 748–781. doi: 10.3390/v2030748.
- Kaufman, S. S., Green, K. Y., & Korba, B. E. (2014). Treatment of Norovirus infections: moving antivirals from the bench to the bedside. *Antiviral Research*, 105, 80–91. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.02.012.
- Kniel, K. (2014). The makings of a good human Norovirus surrogate. *Current Opinion in Virology*, 4, 85–90. doi: 10.1016/j.coviro.2014.01.002.
- Koo, H. L., Ajami, N., Atmar, R. L., & DuPont, H. L. (2010). Noroviruses: the principal cause of foodborne disease worldwide. *Discovery Medicine*, 10(50), 61–70.
- Koo, H. L., Neill, F. H., Estes, M. K., Munoz, F. M., Cameron, A., Dupont, H. L., & Atmar, R. L. (2013). Noroviruses: the most common pediatric viral enteric pathogen at a large university hospital after introduction of Rotavirus vaccination. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 2(1), 57–60. doi: 10.1093/jpids/pis070.

- Lee, B. Y., Wettstein, Z. S., Mcglone, S. M., Bailey, R. R., Umscheid, C. A., Smith, K. J., & Muder, R. R. (2011). Economic value of Norovirus outbreak control measures in healthcare settings. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(4), 640–646. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03345.x.
- Leshem, E., Wikswo, M., Barclay, L., Brandt, E., Storm, W., Salehi, E., ... Hall, A. J. (2013). Effects and clinical significance of GII.4 Sydney Norovirus, United States, 2012-2013. *Emerging Infectious Diseases*, 19(8), 1231–1238. doi: 10.3201/eid1908.130458.
- Li, J., Predmore, A., Divers, E., & Lou, F. (2012). New interventions against human Norovirus: progress, opportunities, and challenges. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 331–352. doi: 10.1146/annurev-food-022811-101234.
- Lim, K. L., Eden, J., Oon, L. L. E., & White, P. A. (2013). Molecular epidemiology of Norovirus in Singapore, 2004-2011. *Journal of Medical Virology*, 85, 1842–1851. doi: 10.1002/jmv.23669.
- Lindesmith, L. C., Donaldson, E., Leon, J., Moe, C. L., Frelinger, J. A., Johnston, R. E., ... Baric, R. S. (2010). Heterotypic humoral and cellular immune responses following Norwalk virus infection. *Journal of Virology*, 84(4), 1800–15. doi: 10.1128/JVI.02179-09.
- Lindesmith, L., Moe, C., Lependu, J., Frelinger, J. A., Treanor, J., & Baric, R. S. (2005). Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge. *Journal of Virology*, 79(5), 2900–9. doi: 10.1128/JVI.79.5.2900-2909.2005.
- Liu, L., Liu, W., Liu, Y., Xiao, H., Jia, N., Liu, G., ... Cao, W. (2010). Identification of Norovirus as the top enteric viruses detected in adult cases with acute gastroenteritis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(4), 717–722. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0491.
- Lopman, B., Gastañaduy, P., Park, G. W., Hall, A. J., Parashar, U. D., & Vinjé, J. (2012). Environmental transmission of Norovirus gastroenteritis. *Current Opinion in Virology*, 2(1), 96–102. doi: 10.1016/j.coviro.2011.11.005.

- Mai, H., Jin, M., Guo, X., Liu, J., Liu, N., Cong, X., ... Wei, L. (2013). Clinical and epidemiologic characteristics of Norovirus GII.4 Sydney during winter 2012-13 in Beijing, China following its global emergence. *PLOS ONE*, 8(8), 1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0071483.
- Manual Merck. (2009). Gastenterite. Acedido a 15 de setembro de 2014, disponível em <http://www.manualmerck.net/?id=132#>.
- Mathijs, E., Stals, A., Baert, L., Botteldoorn, N., Denayer, S., Mauroy, A., ... Thiry, E. (2012). A review of known and hypothetical transmission routes for noroviruses. *Food and Environmental Virology*, 4, 131–152. doi: 10.1007/s12560-012-9091-z.
- Matthews, J. E., Dickey, B. W., Miller, R. D., Felzer, J. R., Dawson, B. P., Lee, A. S., ... Leon, J. S. (2012). The epidemiology of published Norovirus outbreaks: a systematic review of risk factors associated with attack rate and genogroup. *Epidemiology and Infection*, 140(7), 1161–1172. doi: 10.1017/S0950268812000234.
- Mesquita, J. R., Costantini, V. P., Cannon, J. L., Lin, S., São, M., Nascimento, J., & Vinjé, J. (2013). Presence of antibodies against genogroup VI Norovirus in humans. *Virology Journal*, 10(176), 1–5. doi: 10.1186/1743-422X-10-176.
- Miura, T., Sano, D., Suenaga, A., Yoshimura, T., Fuzawa, M., Nakagomi, T., ... Okabe, S. (2013). Histo-blood group antigen-like substances of human enteric bacteria as specific adsorbents for human noroviruses. *Journal of Virology*, 87(17), 9441–9451. doi: 10.1128/JVI.01060-13.
- Moreno-Espinosa, S., Farkas, T., & Jiang, X. (2004). Human caliciviruses and pediatric gastroenteritis. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 15, 237–245. doi: 10.1053/j.spid.2004.07.004.
- Murakami, K., Kurihara, C., Oka, T., Shimoike, T., Fujii, Y., Takai-Todaka, R., ... Katayama, K. (2013). Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. *PLOS ONE*, 8(6), e66534. doi: 10.1371/journal.pone.0066534.

- Nahar, S., Afrad, M. H., Begum, N., Al-Mamun, F., Sarker, A. K., Das, S. K., ... Rahman, M. (2013). High prevalence of noroviruses among hospitalized diarrheal patients in Bangladesh, 2011. *Journal of Infection in Developing Countries*, 7(11), 892–896. doi: 10.3855/jidc.2944.
- Nurminen, K., Blazevic, V., Huhti, L., Rasanen, S., Koho, T., Hytonen, V., & Vesikari, T. (2010). Prevalence of Norovirus GII.4 antibodies in Finnish children. *Journal of Medical Virology*, 1–28. doi: 10.1002/jmv.21990.
- Oldak, E., Sulik, A., Rozkiewicz, D., & Zawadzka, E. (2009). Norovirus and Rotavirus - two major causative agents of sporadic viral gastroenteritis in hospitalized Polish children. *Advances in Medical Sciences*, 54(2), 183–186. doi: 10.2478/v10039-009-0046-z.
- Patel, M. M., Hall, A. J., Vinjé, J., & Parashar, U. D. (2009). Noroviruses: a comprehensive review. *Journal of Clinical Virology*, 44, 1–8. doi: 10.1016/j.jcv.2008.10.009.
- Payne, D. C., Vinjé, J., Szilagyi, P. G., Edwards, K. M., Staat, M. A., Weinberg, G. A., ... Parashar, U. D. (2013). Norovirus and medically attended gastroenteritis in U.S. children. *The New England Journal of Medicine*, 368(12), 1121–1130. doi: 10.1056/NEJMsa1206589.
- Prasad, B. V., Hardy, M. E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M. G., & Estes, M. K. (1999). X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*, 286, 287–290.
- Ramani, S., Atmar, R. L., & Estes, M. K. (2014). Epidemiology of human noroviruses and updates on vaccine development. *Current Opinion in Gastroenterology*, 30(1), 25–33. doi: 10.1097/MOG.0000000000000022.
- Rodrigues, F., Alves, M. C., Alves, A. F., & Lemos, L. (2007). Etiologia das gastroenterites agudas em unidade de internamento de curta duração: estudo prospectivo de 12 meses. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 38(1), 13–17. doi: 0873-9781/07/38-1/13.

- Rohayem, J. (2009). Norovirus seasonality and the potential impact of climate change. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(6), 524–527. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02846.x.
- Rohayem, J., Bergmann, M., Gebhardt, J., Gould, E., Tucker, P., Mattevi, A., ... Neyts, J. (2010). Antiviral strategies to control Calicivirus infections. *Antiviral Research*, 87, 162–178. doi: 10.1016/j.antiviral.2010.05.002.
- Ruvoën, N., & Le Pendu, J. (2013). Sensibilité génétique aux infections à Norovirus. *Pathologie Biologie*, 61, 28–35. doi: 10.1016/j.patbio.2013.01.002.
- Rydell, G. E., Kindberg, E., Larson, G., & Svensson, L. (2011). Susceptibility to winter vomiting disease: a sweet matter. *Reviews in Medical Virology*, 21, 370–382. doi: 10.1002/rmv.
- Sai, L., Sun, J., Shao, L., Chen, S., Liu, H., & Ma, L. (2013). Epidemiology and clinical features of Rotavirus and Norovirus infection among children in Ji'nan, China. *Virology Journal*, 10(302), 1–8. doi: 10.1186/1743-422X-10-302.
- Salgado, M., Castelo, T. M., & Dinis, A. M. (2009). Diarreia aguda na criança - 2^a parte: noções de epidemiologia e medidas preventivas. *Saúde Infantil*, 31(2), 49–58.
- Stals, A., Mathijs, E., Baert, L., Botteldoorn, N., Denayer, S., Mauroy, A., ... Uyttendaele, M. (2012). Molecular detection and genotyping of noroviruses. *Food and Environmental Virology*, 4, 153–167. doi: 10.1007/s12560-012-9092-y.
- Sterk, A., Schijven, J., Nijs, & Husman, A. M. (2013). Direct and indirect effects of climate change on the risk of infection by water-transmitted pathogens. *Environmental Science and Technology*, 47, 12648–12660. doi: 10.1021/es403549s.
- Tamminen, K., Lappalainen, S., Huhti, L., Vesikari, T., & Blazevic, V. (2013). Trivalent combination vaccine induces broad heterologous immune responses to Norovirus and Rotavirus in mice. *PLOS ONE*, 8(7), 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0070409.

- Tan, M., Hegde, R. S., Jiang, X. (2004). The P domain of Norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. *Journal of Virology*, 78(12), 6233–6242. doi: 10.1128/JVI.78.12.6233.
- Tan, M., Huang, P., Xia, M., Fang, P.-A., Zhong, W., McNeal, M., ... Jiang, X. (2011). Norovirus P particle, a novel platform for vaccine development and antibody production. *Journal of Virology*, 85(2), 753–764. doi: 10.1128/JVI.01835-10.
- Tan, M., & Jiang, X. (2005). Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends in Microbiology*, 13(6), 285–93. doi: 10.1016/j.tim.2005.04.004.
- Tan, M., & Jiang, X. (2010). Norovirus gastroenteritis, carbohydrate receptors, and animal models. *PLOS Pathogens*, 6(8), 1–5. doi: 10.1371/journal.ppat.1000983.
- Tan, M., & Jiang, X. (2012). Norovirus P particle: a subviral nanoparticle for vaccine development against Norovirus, Rotavirus and Influenza virus. *Nanomedicine*, 7(6), 889–897. doi: 10.2217/nnm.12.62.
- Thongprachum, A., Chan-it, W., Khamrin, P., Saparpakorn, P., Okitsu, S., Takanashi, S., ... Ushijima, H. (2014). Molecular epidemiology of Norovirus associated with gastroenteritis and emergence of Norovirus GII.4 variant 2012 in Japanese pediatric patients. *Infection, Genetics and Evolution*, 23, 65–73. doi: 10.1016/j.meegid.2014.01.030.
- Thorne, L. G., & Goodfellow, I. G. (2014). Norovirus gene expression and replication. *Journal of General Virology*, 95, 278–291. doi: 10.1099/vir.0.059634-0.
- Thornton, A. C., Jennings-conklin, K. S., & McCormick, M. I. (2004). Noroviruses: agents in outbreaks of acute gastroenteritis. *Disaster Management & Response*, 2(1), 4–9. doi: 10.1016/j.dmr.2003.11.001.
- Trainor, E., Lopman, B., Iturriza-gomara, M., Dove, W., Ngwira, B., Nakagomi, O., ... Cunliffe, N. (2013). Detection and molecular characterisation of noroviruses in hospitalised children in Malawi, 1997-2007. *Journal of Medical Virology*, 85, 1299–1306. doi: 10.1002/jmv.23589.

- Trivedi, T. K., DeSalvo, T., Lee, L., Palumbo, A., Moll, M., Curns, A., ... Lopman, B. a. (2012). Hospitalizations and mortality associated with Norovirus outbreaks in nursing homes, 2009-2010. *Journal of the American Medical Association*, 308(16), 1668–1675. doi: 10.1001/jama.2012.14023.
- van Asten, L., van den Wijngaard, C., van Pelt, W., van de Kassteele, J., Meijer, A., van der Hoek, W., ... Koopmans, M. (2012). Mortality attributable to 9 common infections: significant effect of Influenza A, Respiratory Syncytial virus, Influenza B, Norovirus, and Parainfluenza in elderly persons. *The Journal of Infectious Diseases*, 206, 628–639. doi: 10.1093/infdis/jis415.
- Vega, E., Barclay, L., Gregoricus, N., Shirley, S. H., Lee, D., & Vinjé, J. (2014). Genotypic and epidemiologic trends of Norovirus outbreaks in the United States, 2009 to 2013. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(1), 147–55. doi: 10.1128/JCM.02680-13.
- Viegas, S., Cunha, I., Correia, C., Coelho, A., Maia, C., Pena, C., ... Saraiva, M. (2014). Investigação laboratorial de toxinfecções alimentares, 2013. *Boletim Epidemiológico - Observações*, 7(1), 3–6.
- Wang, J., & Deng, Z. (2012). Detection and forecasting of oyster Norovirus outbreaks: recent advances and future perspectives. *Marine Environmental Research*, 80, 62–69. doi: 10.1016/j.marenvres.2012.06.011.
- Weber, D. J., Rutala, W. A., Miller, M. B., Huslage, K., & Sickbert-Bennett, E. (2010). Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: Norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *American Journal of Infection Control*, 38(5), 25–33. doi: 10.1016/j.ajic.2010.04.196.
- Wikswa, M. E., Desai, R., Edwards, K. M., Staat, M. A., Szilagyi, P. G., Weinberg, G. A., ... Hall, A. J. (2013). Clinical profile of children with Norovirus disease in Rotavirus vaccine era. *Emerging Infectious Diseases*, 19(10), 1691–1693. doi: 10.3201/eid1910.130448.

- Wikswa, M. E., & Hall, A. J. (2012). Outbreaks of acute gastroenteritis transmitted by person-to-person contact - United States, 2009-2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 61(9), 1–12.
- Yu, Y., Yan, S., Li, B., Pan, Y., & Wang, Y. (2014). Genetic diversity and distribution of human Norovirus in China (1999–2011). *BioMed Research International*, 2014, 1–13. doi: 10.1155/2014/196169.
- Zainazor, T., Hidayah, M. S. N., Chai, L. C., Tunung, R., Ghazali, F. M., & Son, R. (2010). The scenario of Norovirus contamination in food and food handlers. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(2), 229–237. doi: 10.4014/jmb.0906.06032.
- Zingg, W., Colombo, C., Jucker, T., Bossart, W., & Ruef, C. (2005). Impact of an outbreak of Norovirus infection on hospital resources. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 26(3), 263–267.